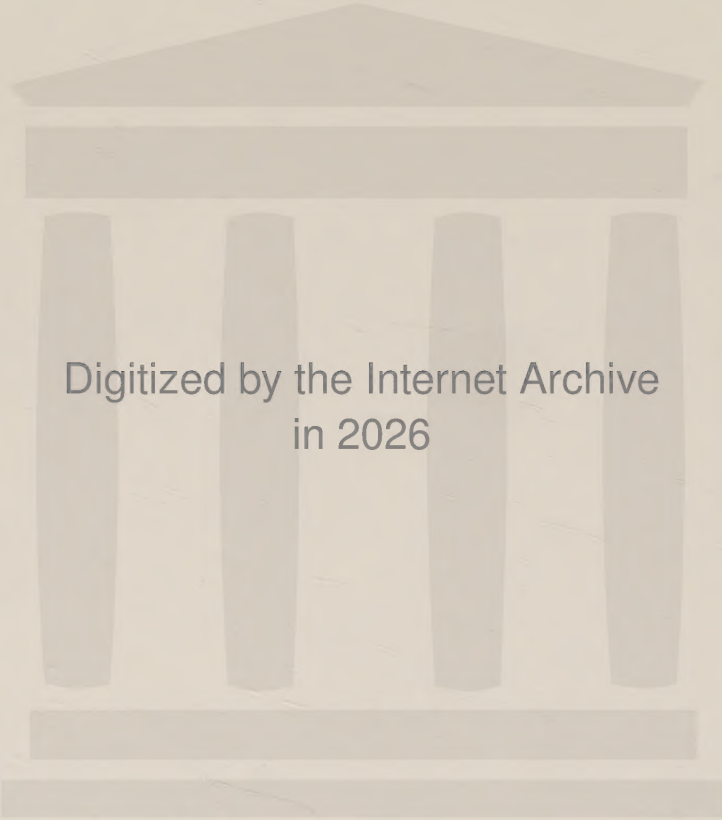


**INTERAKTION VON cAMP UND
KALZIUMIONEN BEI DER REGULATION DES
NATRIUMTRANSPORTS AN DER
FROSCHHAUT**

Eine Studie mit dem Ionophor A 23187

WALTER SCHRATT

1986



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41554824_0021

Aus dem Physiologischen Institut der Universität München

Vorstand: Prof. Dr. med. Dr. h.c. Klaus Thureau

Prof. Dr. med. Gerrit ten Bruggencate

Prof. Dr. med. Eckehart Gerlach

*INTERAKTION VON cAMP UND KALZIUM-
IONEN BEI DER REGULATION DES
NATRIUMTRANSPORTS AN DER
FROSCHHAUT*

EINE STUDIE MIT DEM IONOPHOR A 23187

Dissertation

zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin

an der Medizinischen Fakultät der

Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Walter Schratt

München

1986

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der
Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. Dr. K. Thureau

Mitberichterstatter: Prof. Dr. J. Eigler

Prof. Dr. G. Riecker

Mitbetreuung durch den

promovierten Mitarbeiter: Priv.-Doz. Dr. R. Rick

Dekan: Prof. Dr. W. Spann

Tag der mündlichen Prüfung: 24.02.87

Inhaltsverzeichnis

		Seite
I.	Einleitung	1
II.	Die Entwicklung der Sprache	2
III.	Die Entwicklung der Schrift	3
IV.	Die Entwicklung der Zeichnung	4
V.	Die Entwicklung des Zeichens	5
VI.	Die Entwicklung der Zeichnung	6
VII.	Die Entwicklung der Zeichnung	7
VIII.	Die Entwicklung der Zeichnung	8
IX.	Die Entwicklung der Zeichnung	9
X.	Die Entwicklung der Zeichnung	10
XI.	Die Entwicklung der Zeichnung	11
XII.	Die Entwicklung der Zeichnung	12
XIII.	Die Entwicklung der Zeichnung	13
XIV.	Die Entwicklung der Zeichnung	14
XV.	Die Entwicklung der Zeichnung	15
XVI.	Die Entwicklung der Zeichnung	16
XVII.	Die Entwicklung der Zeichnung	17
XVIII.	Die Entwicklung der Zeichnung	18
XIX.	Die Entwicklung der Zeichnung	19
XX.	Die Entwicklung der Zeichnung	20
XXI.	Die Entwicklung der Zeichnung	21
XXII.	Die Entwicklung der Zeichnung	22
XXIII.	Die Entwicklung der Zeichnung	23
XXIV.	Die Entwicklung der Zeichnung	24
XXV.	Die Entwicklung der Zeichnung	25
XXVI.	Die Entwicklung der Zeichnung	26
XXVII.	Die Entwicklung der Zeichnung	27
XXVIII.	Die Entwicklung der Zeichnung	28
XXIX.	Die Entwicklung der Zeichnung	29
XXX.	Die Entwicklung der Zeichnung	30
XXXI.	Die Entwicklung der Zeichnung	31
XXXII.	Die Entwicklung der Zeichnung	32
XXXIII.	Die Entwicklung der Zeichnung	33
XXXIV.	Die Entwicklung der Zeichnung	34
XXXV.	Die Entwicklung der Zeichnung	35
XXXVI.	Die Entwicklung der Zeichnung	36
XXXVII.	Die Entwicklung der Zeichnung	37
XXXVIII.	Die Entwicklung der Zeichnung	38
XXXIX.	Die Entwicklung der Zeichnung	39
XL.	Die Entwicklung der Zeichnung	40
XLI.	Die Entwicklung der Zeichnung	41
XLII.	Die Entwicklung der Zeichnung	42
XLIII.	Die Entwicklung der Zeichnung	43
XLIV.	Die Entwicklung der Zeichnung	44
XLV.	Die Entwicklung der Zeichnung	45
XLVI.	Die Entwicklung der Zeichnung	46
XLVII.	Die Entwicklung der Zeichnung	47
XLVIII.	Die Entwicklung der Zeichnung	48
XLIX.	Die Entwicklung der Zeichnung	49
L.	Die Entwicklung der Zeichnung	50
LI.	Die Entwicklung der Zeichnung	51
LII.	Die Entwicklung der Zeichnung	52
LIII.	Die Entwicklung der Zeichnung	53
LIV.	Die Entwicklung der Zeichnung	54
LV.	Die Entwicklung der Zeichnung	55
LVI.	Die Entwicklung der Zeichnung	56
LVII.	Die Entwicklung der Zeichnung	57
LVIII.	Die Entwicklung der Zeichnung	58
LIX.	Die Entwicklung der Zeichnung	59
LX.	Die Entwicklung der Zeichnung	60
LXI.	Die Entwicklung der Zeichnung	61
LXII.	Die Entwicklung der Zeichnung	62
LXIII.	Die Entwicklung der Zeichnung	63
LXIV.	Die Entwicklung der Zeichnung	64
LXV.	Die Entwicklung der Zeichnung	65
LXVI.	Die Entwicklung der Zeichnung	66
LXVII.	Die Entwicklung der Zeichnung	67
LXVIII.	Die Entwicklung der Zeichnung	68
LXIX.	Die Entwicklung der Zeichnung	69
LXX.	Die Entwicklung der Zeichnung	70
LXXI.	Die Entwicklung der Zeichnung	71
LXXII.	Die Entwicklung der Zeichnung	72
LXXIII.	Die Entwicklung der Zeichnung	73
LXXIV.	Die Entwicklung der Zeichnung	74
LXXV.	Die Entwicklung der Zeichnung	75
LXXVI.	Die Entwicklung der Zeichnung	76
LXXVII.	Die Entwicklung der Zeichnung	77
LXXVIII.	Die Entwicklung der Zeichnung	78
LXXIX.	Die Entwicklung der Zeichnung	79
LXXX.	Die Entwicklung der Zeichnung	80
LXXXI.	Die Entwicklung der Zeichnung	81
LXXXII.	Die Entwicklung der Zeichnung	82
LXXXIII.	Die Entwicklung der Zeichnung	83
LXXXIV.	Die Entwicklung der Zeichnung	84
LXXXV.	Die Entwicklung der Zeichnung	85
LXXXVI.	Die Entwicklung der Zeichnung	86
LXXXVII.	Die Entwicklung der Zeichnung	87
LXXXVIII.	Die Entwicklung der Zeichnung	88
LXXXIX.	Die Entwicklung der Zeichnung	89
LXXXX.	Die Entwicklung der Zeichnung	90
LXXXXI.	Die Entwicklung der Zeichnung	91
LXXXXII.	Die Entwicklung der Zeichnung	92
LXXXXIII.	Die Entwicklung der Zeichnung	93
LXXXXIV.	Die Entwicklung der Zeichnung	94
LXXXXV.	Die Entwicklung der Zeichnung	95
LXXXXVI.	Die Entwicklung der Zeichnung	96
LXXXXVII.	Die Entwicklung der Zeichnung	97
LXXXXVIII.	Die Entwicklung der Zeichnung	98
LXXXXIX.	Die Entwicklung der Zeichnung	99
LXXXXX.	Die Entwicklung der Zeichnung	100

meinen Eltern

Inhaltsverzeichnis

	Seite
I. <u>Einleitung</u>	1
II. <u>Literaturübersicht</u>	4
II.1. Natriumtransport an der Froschhaut	4
II.2. Cyclisches Adenosinmonophosphat (cAMP)	8
II.2.1. Entdeckung von cAMP	8
II.2.2. Chemische und physikalische Eigenschaften von cAMP	10
II.2.3. Regulation des zellulären cAMP	10
II.2.4. Natriumtransport und cAMP	11
II.3. Methoden zur Gewinnung von isoliertem Epithel an der Froschhaut	12
II.4. Ca-Ionophor A 23187	15
II.5. Natrium-, Wassertransport und Kalzium	17
II.6. Bisherige cAMP-Bestimmungen an der Froschhaut	26
III. <u>Methode</u>	29
III.1. Tiermaterial	29
III.2. Präparation	29
III.3. Gewinnung des Zellextraktes	30
III.4. Weiterverarbeitung des Zellextraktes	33
III.4.1. Reinigungsverfahren	34
III.4.2. Entfernung von cAMP aus dem Epithelzell- extrakt	35

III.5.	Bestimmung von cAMP	36
III.6.	Messung des Kurzschlußstroms (SCC)	41
III.7.	Verwendete Lösungen und Inkubationsbedingungen	44
III.8.	Experimente unter Verwendung von Ca-Ionophor A 23187	45
III.9.	Kaliumbestimmung zur Zellmengenstandardi- sierung	47
III.10.	Bestimmung der Trockengewichte	48
III.11.	Statistik	48
IV.	<u>Ergebnisse</u>	49
IV.1.	Erstellung der Eichgeraden	49
IV.2.	Korrelation von Kaliumkonzentration im Zell- extrakt und Trockengewicht	51
IV.3.	Wirkungen von Arginin-Vasopressin (AVP) und Isobutylmethylxanthin (IBMX) auf den Kurz- schlußstrom und die intrazelluläre cAMP- Konzentration	52
IV.4.	Komponenten innerhalb des cAMP-Assays	58
IV.4.1.	Wirkung von Phosphodiesterase (PDE) und Aktivkohle auf die cAMP-Bestimmungen	58
IV.4.2.	Einfluß verschiedener Reinigungsverfahren auf die intraepitheliale cAMP-Bestimmung	65
IV.5.	Wirkungen von Ca-Ionophor A 23187 auf die intraepitheliale cAMP-Konzentration	69
IV.6.	Zusammenhang zwischen cAMP-Konzentration und Kurzschlußstrom	73

V.	<u>Diskussion</u>	75
V.1.	Bisherige Präparationstechniken zur Gewinnung von isolierten Epithelzellen der Froschhaut	76
V.1.1.	Präparationsverfahren bei den bisherigen cAMP-Bestimmungen an der Froschhaut	80
V.2.	Anwendbarkeit der neuen Methodik zur Gewinnung von isolierten Epithelzellen der Froschhaut	83
V.2.1.	Inkubation der Froschhäute	83
V.2.2.	Gewinnung isolierter Epithelzellen	84
V.2.3.	Aufschluß der Epithelzellen	86
V.2.4.	Quantifizierung der gemessenen cAMP-Mengen	87
V.3.	Diskussion der Ergebnisse der cAMP-Messungen	90
V.3.1.	Interferenzen im cAMP-Bestimmungsassay	96
V.3.2.	Mögliche Fehlerquellen im Bestimmungsassay	99
V.3.3.	Vergleich mit anderen cAMP-Messungen an der Froschhaut	105
V.3.4.	Wirkungen des Ca-Ionophors A 23187 auf die cAMP-Konzentration in der Froschhaut	110
VI.	<u>Zusammenfassung</u>	120
VII.	<u>Literaturverzeichnis</u>	123

I. Einleitung

Da das Natriumion mit seinen zugehörigen Anionen Chlorid und Bikarbonat mehr als 90 % der osmotisch wirksamen Substanzen im extrazellulären Raum ausmacht, wird über den Natriumbestand des Extrazellulärtraumes auch die Größe des extrazellulären Volumens festgelegt. Deshalb wird unter physiologischen Bedingungen die im Extrazellulärraum des Organismus befindliche Natriummenge und -konzentration in sehr engen Grenzen konstant gehalten. Voraussetzung hierfür ist ein Gleichgewicht zwischen aufgenommener und ausgeschiedener Menge an Natrium. Sowohl bei der Aufnahme von Natriumsalzen im Darm als auch bei deren Ausscheidung, die im wesentlichen über die Niere erfolgt, spielen transepitheliale Natriumtransporte eine wichtige Rolle.

Ein solcher aktiver transepithelialer Natriumtransport wurde erstmals 1949 von Ussing an der Froschhaut nachgewiesen. 1958 wurde von Koefoed - Johnsen und Ussing ein erstes Modell für den transepithelialen Natriumtransport vorgelegt, das auch heute noch in seinen Grundzügen Gültigkeit besitzt. Nach dieser Modellvorstellung (Abb. 1) setzt sich der transepitheliale Natriumtransport aus zwei Einzelschritten zusammen: Natrium strömt passiv über die äußere apikale Zellmembran in das zelluläre Transportkompartiment ein und wird dann unter Verbrauch von Stoffwechselenergie aktiv und im Austausch gegen Kalium über die innere, basolaterale Membran aus der Epithelzelle heraustransportiert.

Untersuchungen an Warmblüterepithelien wie dem distalen

Tubulus der Niere und dem Colon haben gezeigt, daß ähnliche Transportprozesse auch an diesen Strukturen ablaufen. Aufgrund der Tatsache, daß transepitheliale Transportstudien an isolierten Kaltblüterepithelien doch sehr viel leichter als an Warmblüterepithelien durchgeführt werden können, wird die Froschhaut auch heute noch bevorzugt zur Charakterisierung der Einzelschritte des transepithelialen Natriumtransports herangezogen.

Viele der neueren Untersuchungen befaßen sich mit der Regulation des transepithelialen Natriumtransports. Im Vordergrund des Interesses stand dabei die Beeinflußbarkeit des Transports durch die extra- und intrazelluläre Elektrolytzusammensetzung und durch hormonelle Systeme. Nach dem heutigen Kenntnisstand muß man davon ausgehen, daß beide Regulationssysteme vor allem Einfluß auf die apikale Membran der Epithelzelle nehmen können. Von einer Reihe von Hormonen wie dem Antidiuretischen Hormon (ADH), dem Oxytocin, dem Adrenalin und den Prostaglandinen ist bekannt, daß sie am Froschhautepithel eine natriferische Wirkung hervorrufen. Dieser natriferische Effekt der Hormone beruht auf einer Erhöhung der intrazellulären cAMP-Konzentration, wobei das cAMP seinerseits als "second messenger" die Natriumleitfähigkeit an der Zellmembran der natriumtransportierenden Epithelzelle erhöht. Im Gegensatz dazu wird vermutet, daß eine Erhöhung der intrazellulären Natrium- oder Kalziumkonzentration zu einer Erniedrigung der apikalen Leitfähigkeit an der Epithelzelle führt.

In der vorliegenden Arbeit sollten speziell die Mechanismen untersucht werden, die bei einer Erhöhung der intrazellulären Kalziumkonzentration durch den Ca-Ionophor A 23187 zur Modulation

des transepithelialen Natriumtransports führen. Zur Untersuchung eines möglichen Einflusses des Ca-Ionophors A 23187 auf den cAMP-Stoffwechsel in der Zelle erfolgte die Bestimmung intrazellulärer cAMP-Spiegel unter verschiedenen experimentellen Bedingungen. Dazu wurden auch die Substanzen AVP (Arginin-Vasopressin), das wie ADH den intrazellulären cAMP-Spiegel durch Stimulation der Adenylcyclase steigert und der Phosphodiesterase-Inhibitor IBMX (Isobuthylmethylxanthin), der die intrazelluläre cAMP-Konzentration durch Hemmung des Abbaus erhöht, herangezogen.

Im Mittelpunkt der Arbeit standen somit folgende Fragen:

- (1) Kann die Wirkung des Ca-Ionophors A 23187 auf den transzellulären Natriumtransport durch Modulation des intrazellulären cAMP erklärt werden mit der Frage einer möglichen Interferenz von A 23187 und AVP oder
- (2) beruhen die Wirkungen des Ca-Ionophors allein auf Verschiebungen der intrazellulären Elektrolytzusammensetzung?

Um die unter (1) angeführte Frage beantworten zu können, wurde in einem ersten Schritt ein neues Verfahren zur Trennung der Froschhautepithelzellen vom Bindegewebe entwickelt. Der Extrakt dieser Zellen diente dann der Messung intrazellulärer cAMP-Konzentrationen.

II. Literaturübersicht

II.1. Natriumtransport an der Froschhaut

Bereits im Jahre 1848 beobachtete Du Bois-Reymond, daß die Froschhaut zwischen Außen- und Innenseite eine elektrische Potentialdifferenz von bis zu 100 mV aufrechterhält, wobei die Hautinnenseite gegenüber der Außenseite positiv geladen ist.

Zweiundvierzig Jahre später, 1890, entdeckte Reid an der isolierten Froschhaut einen von außen nach innen gerichteten Flüssigkeitstransport, der an die Vitalität der Haut gebunden war und auch bei Fehlen von Druckdifferenzen osmotischer oder hydrostatischer Natur aufrechterhalten wurde. Reid beobachtete bereits damals eine Hemmung dieses Flüssigkeitstransportes durch Herzglykoside, in seinem Fall bei Verwendung von Digitalis.

Aufgrund der Beobachtungen von Galeotti (1904), daß die Aufrechterhaltung der Potentialdifferenz an der Froschhaut an die Anwesenheit von Natrium- oder Lithiumionen im Außenbad gebunden war, ergaben sich erste Hinweise auf den Charakter des Froschhautpotentials. Durch die Entwicklung radioaktiver Isotope in den vierziger Jahren wurde es möglich, die Natur der Transportprozesse, die für die Aufrechterhaltung des transepithelialen Potentials verantwortlich ist, genauer zu analysieren. So konnten verschiedene Autoren (Katzin, 1939; Ussing, 1949) nachweisen, daß der unidirektionale, transepitheliale Einstrom von radioaktivem Natrium an der Froschhaut den entgegengesetzten Ausstrom mengenmäßig deutlich übertrifft. Da Natrium sowohl gegen chemische als

auch gegen elektrische Gradienten nettomäßig absorbiert wurde, nahm Ussing einen aktiven Transportmechanismus an.

Einen wichtigen Schritt in der Erforschung transepithelialer Transportprozesse stellte die Entwicklung und Einführung der Kurzschlußstrommethode durch Ussing und Zerahn (1951) dar. Hierbei wird die Haut auf beiden Seiten mit identischen Badelösungen gespült und das Hautpotential mit Hilfe einer äußeren Stromquelle auf Null kompensiert. Da unter diesen Bedingungen äußere, passiv treibende Kräfte eliminiert sind, kann eine Differenz in den unidirektionalen Flüssen nur auf einen aktiven Transportprozeß zurückgeführt werden. Ussing und Zerahn beobachteten 1951 unter diesen Kurzschlußstrombedingungen eine Differenz der unidirektionalen Natriumflüsse mit einem wesentlich größeren transepithelialen Natriumeinwärts- als Auswärtsstrom. Die sich hieraus ergebende Nettonatriumresorption entsprach quantitativ dem Kurzschlußstrom ($=$ Strom im äußeren Stromkreis). Da diese Beziehung zwischen Nettonatriumtransport und Kurzschlußstrom in vielen weiteren Experimenten nachvollzogen werden konnte (z.B. Kirschner, 1955; Koefoed-Johnsen und Ussing, 1958; Dörge et al., 1977), steht mit genanntem Kurzschlußstrom ein leicht meßbarer quantitativer Parameter der transepithelialen Natriumtransportleistung zur Verfügung.

Eine Konsequenz solcher Kurzschlußstrommessungen war die Charakterisierung der Einzelschritte des transepithelialen Natriumtransports. Ausgehend von einem von Ussing (1949) und Ussing und Zerahn (1951) bereits skizzierten Zweibarrierenmodell entwickelten Koefoed-Johnsen und Ussing (1958) ein erstes, in

sich geschlossenes Konzept des transepithelialen Natriumtransports (siehe Abb. 1).

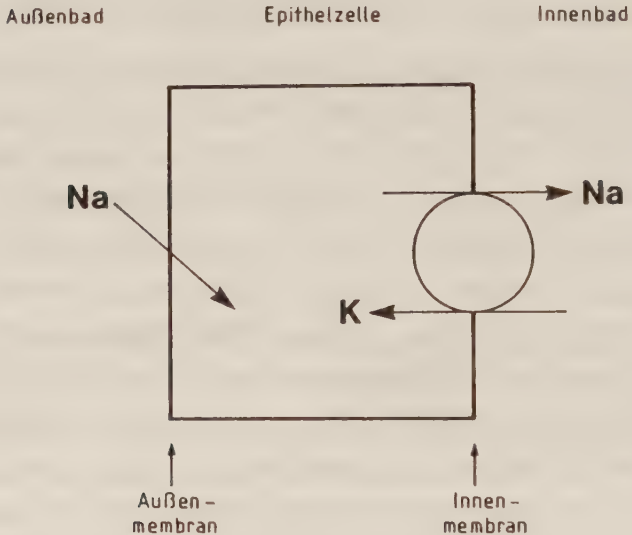


Abb. 1: 2-Membranen-Konzept des transepithelialen Natriumtransports

Danach setzt sich der transepitheliale Natriumtransport aus zwei unterschiedlichen Transportschritten zusammen: Natrium strömt passiv entlang einem elektrochemischen Gradienten über die Außenmembran (= apikale Zellmembran) in die Epithelzelle ein und wird aktiv, unter Verbrauch von Stoffwechselenergie, im Austausch gegen Kalium über die innere, basolaterale Zellmembran wieder heraustransportiert. Das einwärts transportierte Kalium diffundiert passiv, entlang einem elektrochemischen Gradienten

wieder ins Innenbad zurück.

In den vergangenen 20 Jahren wurden die Grundzüge dieses 2-Membranen-Konzepts für nahezu alle transportaktiven Epithelien bestätigt (siehe Übersicht bei Ussing et al., 1974; Eriij, 1976).

Aufgrund der Tatsache, daß die Froschhaut sich aus mehreren Epithelzellagen zusammensetzt (siehe Kap. II.2), stellte sich die Frage, welche Zelle - bzw. -lagen für den Transport von Natrium verantwortlich sind und somit das Transportkompartiment bilden. Die Beantwortung dieser Frage erfolgte unter anderem auch im hiesigen Institut durch die Anwendung der Elektronenstrahlmikroanalyse. Mit Hilfe dieser Methode wurde es möglich, in äußerst dünnen, gefriergetrockneten Gewebeschnitten Ionenkonzentrationen selbst in subzellulären Strukturen zu bestimmen (Rick et al., 1978, 1984; Dörge et al., 1981). Es konnte gezeigt werden, daß alle Epithelschichten der Froschhaut - mit Ausnahme des Stratum corneum - am transepithelialen Natriumtransport beteiligt sind und somit im Sinne eines Transportsynzytiums zusammenarbeiten (Rick et al., 1978). Dieser Schluß ergab sich vor allem aus der Beobachtung, daß unter verschiedenen experimentellen Bedingungen die intrazellulären Natrium- und Kaliumkonzentrationen in allen Zellagen gleichgerichteten Änderungen unterworfen sind.

II.2. Cyclisches Adenosinmonophosphat (cAMP)

II.2.1. Entdeckung von cAMP

Adenosin-3-5-Phosphat (= cyclisches Adenosinmonophosphat = cAMP) wurde 1957 von zwei Forschergruppen unabhängig voneinander entdeckt. Cook, Lipkin und Markham (1957) untersuchten die Hydrolyse von Adenosintriphosphat (ATP) in Anwesenheit von Bariumhydroxid und fanden dabei neben den Hauptprodukten wie Adenosinmonophosphat und anorganischem Pyrophosphat auch das in Abb. 2 dargestellte cyclische Adenosinmonophosphat ohne jedoch gleich dessen chemischen Aufbau genau verifizieren zu können.

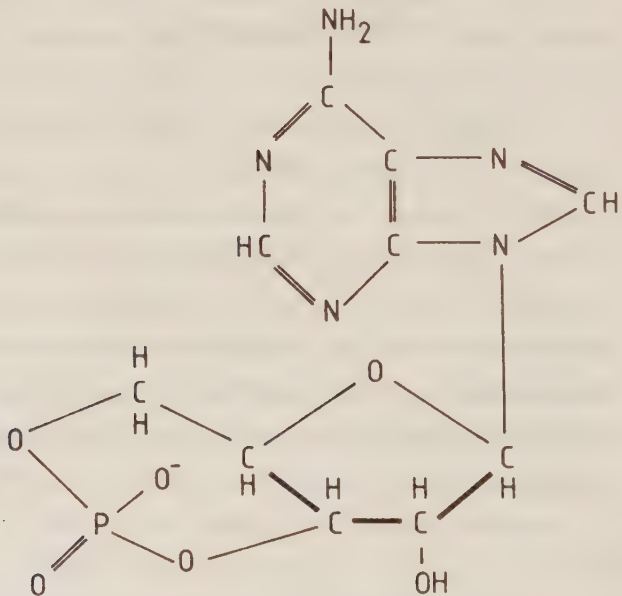


Abb. 2: Chemische Strukturformel von cyclischem Adenosinmonophosphat

Zur gleichen Zeit gelang es Rall und Sutherland (Rall et al., 1957; Rall und Sutherland, 1958; Sutherland und Rall, 1958) cAMP aus isoliertem Lebergewebe zu gewinnen. Diese Autoren, die die Wirkung von Epinephrin und Glucagon auf die Aktivität der Phosphorylase in der Leber untersuchten, stellten fest, daß in ihren Leberhomogenaten unter dem Einfluß hormoneller Substanzen in einem ersten Schritt ein "hitzestabiler Faktor" gebildet wurde, der seinerseits wieder in der Lage war, in einem zweiten Schritt Leberphosphorylase zu aktivieren. Dies war sogar in solchen Fraktionen möglich, in denen die Hormone selbst keine Aktivitätsänderungen mehr induzierten. Die Entstehung des Faktors selbst war an die Anwesenheit von ATP und Magnesiumionen im Inkubationsmedium gebunden.

Beide Forschergruppen fanden heraus, daß die entdeckte Substanz zu gleichen Teilen aus Adenosin, Ribose und Phosphat bestehen mußte. Bei der Suche nach geeigneten Enzymen zur genaueren Klärung der chemischen Struktur der gefundenen Substanz kam es zum wissenschaftlichen Austausch zwischen den beiden Forschergruppen. Zunächst stellte sich heraus, daß der von beiden Forschergruppen auf verschiedene Weise isolierte Stoff letztendlich identisch war, ohne daß jedoch die genaue Struktur zu diesem Zeitpunkt bekannt war. In ersten Studien (Cook et al., 1957) wurde die Substanz für ein Dinukleotid gehalten, doch schon bald stellte sich heraus (Lipkin et al., 1959), daß es sich um ein Mononukleotid handelte, wobei das Phosphat sowohl in Stellung 5' als auch 3' an die Ribose des Adenosins gekoppelt ist und somit eine Art Ringbildung zustande kommt (siehe Abb. 2).

II.2.2. Chemische und physikalische Eigenschaften von cAMP

Das Molgewicht von cAMP beträgt 328, das Ultraviolett-Spektrum und der molare Extinktionskoeffizient von cAMP entsprechen dem des Adenosin-5-Phosphats (Sutherland und Rall, 1960). Im Vergleich zu anderen Adenosinphosphaten wie z.B. Adenosin-2-3-Phosphat ist cAMP chemisch sehr stabil. Es kann bei leicht saurem oder alkalischem pH-Wert 30 Minuten oder länger gekocht werden ohne wesentlichen Verlust an Aktivität (Sutherland und Rall, 1958).

II.2.3. Regulation des zellulären cAMP

Die Wirkungen von Vasopressin (ADH) auf den transepithelialen Natrium- und Wassertransport werden durch eine Interaktion des Hormons mit einem spezifischen Rezeptor in der basalen Zellmembran initiiert. Auf Grund von vielfachen Untersuchungen an verschiedenen Geweben entwickelte man folgendes Schema für das Zusammenwirken von Hormon, Rezeptor und Adenylcyclase:

Drei Hauptbestandteile müssen in der Membran der entsprechenden Zelle vorhanden sein, damit das Hormon seine Wirkungen entfalten kann: a) ein Rezeptor für das Hormon, b) ein regulatorisch wirksames Protein, das zur Bindung von Guanosin-Nukleotiden befähigt ist und c) das System der Adenylcyclase (Handler und Orloff, 1981).

Die Rezeptoren werden heute allgemein als in der Membran

eingebettete Proteine errichtet, die spezifische Hormone zu binden vermögen. Dieser Hormon-Rezeptor-Komplex koppelt sich an die Adenylcyclase, die dadurch aktiviert ATP in cAMP umwandelt.

Das Guanosin-Nukleotid bindende Protein ist dem Zellinnern exponiert und bindet Guanosintriphosphat (GTP) und Guanosindiphosphat (GDP). In Abhängigkeit vom gebundenen Nukleotid reguliert dieses Protein a) die Affinität des Rezeptors für das Hormon und b) die Kopplung des Hormon-Rezeptor-Komplexes an die Adenylcyclase.

II.2.4. Natriumtransport and cAMP

1962 stellten Orloff und Mitarbeiter (1962) die Vermutung auf, daß cAMP bei der durch Vasopressin vermittelten Steigerung der Wasserpermeabilität und des Natriumtransports an der Krötenharnblase eine wichtige Rolle spielen könnte, was sie mit der Ähnlichkeit der Wirkungen von Vasopressin, Theophyllin und exogen appliziertem cAMP auf die Transporteigenschaften der Krötenharnblase begründeten. Allerdings waren die Untersucher zu diesem Zeitpunkt noch nicht in der Lage, einen Vasopressin-induzierten cAMP-Anstieg in den Epithelzellen der Krötenharnblase nachzuweisen. Dieses gelang jedoch Handler und seinen Mitarbeitern 1965 für dieses Epithel (Handler et al., 1965). Diese Gruppe konnte sowohl unter Theophyllin- als auch Vasopressininkubation eine Erhöhung der intrazellulären cAMP-Konzentration nachweisen. Außerdem beobachteten sie einen synergistischen Effekt beider

Substanzen in Bezug auf die intrazelluläre cAMP-Bildung. Damit waren eindeutige Hinweise erbracht, daß in Epithelien wie auch in Zellen der Leber, des Skelettmuskels, des Herzmuskels und vielen anderen mehr (siehe Sutherland und Rall, 1960; Robison et al., 1971) cAMP mit großer Wahrscheinlichkeit als second messenger fungiert.

Die ersten Messungen von cAMP in der Froschhaut erfolgten erst im Jahre 1975 (Schorderet et al., 1975), was wohl in dem Problem begründet war, isoliertes Froschhautepithel zu gewinnen. Auch am Froschhautepithel konnte die Rolle von cAMP als second messenger für Hormonwirkungen bestätigt werden (Schorderet et al., 1975, 1978; Hall et al., 1976; Johnsen und Nielsen, 1978, 1980, 1982).

II.3. Methoden zur Gewinnung von isoliertem Epithel an der Froschhaut

Die sehr häufig zur Untersuchung des Natriumtransports verwendete Froschhaut ist ein komplex aufgebautes Organ, das sich aus mehreren morphologisch und funktionell verschiedenen Lagen zusammensetzt.

Das nach außen gerichtete Epithel besteht aus folgenden Epithelzellagen (von außen nach innen): Stratum corneum, Stratum granulosum, Stratum spinosum und Stratum germinativum. Daran schließt sich nach innen die Basalmembran, das Corium und schließlich die Tela subkutanea an. Im Bindegewebe befinden sich

außerdem zahlreiche Drüsen, deren Ausführungsgänge durch das Oberflächenepithel hindurch an die Hautoberfläche reichen.

Diese Komplexität der Froschhaut führte bei der Suche nach einem morphologischen Korrelat für die beobachteten Transportvorgänge zwangsläufig zu Schwierigkeiten. So wurden neben dem Epithel unter anderem auch schon die Basalmembran (Ottoson et al., 1953) oder die Tela subkutanea (Scheer et al., 1960) als die zur Aufrechterhaltung des Ionentransports wichtigen Strukturen innerhalb der Froschhaut erachtet.

Wie im vorigen Kapitel dargestellt, ist der transepitheliale Natriumtransport allerdings eine alleinige Leistung der Epithelzellen ohne Beteiligung des darunterliegenden Bindegewebes. Da die Epithelzellen jedoch nur etwa 20 % der Gesamtdicke der Froschhaut ausmachen (Rajerison et al., 1972), ist es bei der Bestimmung von Substanzkonzentrationen in der Epithelzelle unter verschiedenen experimentellen Bedingungen wünschenswert, eine Präparation der isolierten Epithelzellschicht zu erhalten. Zur Gewinnung des isolierten Epithels wurden von verschiedenen Autoren mehrere unterschiedliche Präparationsverfahren vorgeschlagen.

Skjelvale und Mitarbeiter (1960) fanden, daß nach zwanzigstündiger Inkubation der Haut in Ringerlösung mit 4 mM NaHCO_3 das Corium leicht von der Gesamthaut abgetrennt werden konnte. Fishman und Macey (1968) konnten an solchen Epithelien nachweisen, daß Kurzschlußstrom und Potential sich nicht wesentlich von denen unbehandelter Epithelien unterscheiden. Trotzdem ist es natürlich berechtigt zu fragen, inwieweit die Haut durch a) die lange Inkubation und b) das basische Inkubationsmedium nicht doch

Schaden genommen hat.

Ein rein physikalisches Trennungsvorfahren wandten Rawlins und Mitarbeiter (1970) an der Krötenhaut (*Bufo marinus*) an. Die Trennung des Epithels vom darunterliegenden Bindegewebe erfolgte durch Anwendung von hohem hydrostatischem Druck (140 cm Wassersäule) für 30 bis 60 Minuten auf die Innenseite der Haut. Auf diese Weise konnten kleine, bis zu einem Quadratzentimeter große Epithelareale gewonnen werden, wobei die Trennung zwischen Epithel und Bindegewebe an der Grenze von Basalmembran und Stratum germinativum erfolgte. Die Transportleistungen der Haut und ihre Reaktion auf ADH waren nach Angaben der Verfasser erhalten. Jedoch muß einschränkend gesagt werden, daß die Autoren im Stratum germinativum eindeutige Zellschädigungen erkannten, die wahrscheinlich durch die Präparationstechnik bedingt waren.

Nach Angaben von Erlij und Aceves (1969) ist diese Methodik auf die Froschhaut von *Rana pipiens* nicht anwendbar. Sie entwickelten daher eine Methode, bei der Kollagenase und hydrostatischer Druck angewendet werden (Erlij und Aceves, 1969; Aceves und Erlij, 1971). Dabei wird die Froschhaut von innen zwei Stunden lang mit Kollagenase inkubiert. Im Anschluß daran wird mit Ringerlösung 15 Minuten auf die Innenseite ein Druck von 30 cm Wassersäule ausgeübt. Wie sich unter lichtmikroskopischer Untersuchung erwies, besteht das auf diese Weise gewonnene Epithel zu ca. 80 % aus Epithelzellen, die restlichen 20 % werden von Drüsenzellen gebildet.

Diese Methodik wurde von Rajerison und seinen Mitarbeitern (1972) für *Rana esculenta* noch weiter modifiziert. Die Innenseite

der Froschhaut wurde mit Ringer mit 43 U/ml Kollagenase und 5 mM Glucose behandelt und das die Epithelaußenseite badende Medium mit Luft begast. Während der gesamten Inkubationsdauer von 90 Minuten bei 35°C wurde auf die Innenseite ein Druck von 15 cm Wassersäule ausgeübt. Auf diese Weise konnten Epithelstücke mit einer Gesamtfläche von maximal 20 cm² gewonnen werden. Morphologische Studien zeigten, daß a) die Trennung des Epithels vom Corium zwischen Basalmembran und Stratum germinativum stattfindet und b) sich keine Zeichen morphologischer Änderungen ergaben (Carasso et al., 1971). Auch sollte die Oxygenierung des Außenbades und die Zugabe von Glukose zum Innenbad die Ergebnisse der Inkubation deutlich verbessern.

Im Gegensatz zu den bisher beschriebenen Techniken gelang Thompson und Mills (1981) die Präparation eines drüsenfreien Epithels. Sie wählten bei ihrem Verfahren folgende Inkubationsbedingungen: 100 U Kollagenase/ml Ringer und 2,5 mM Glucose, 2,5 cm Wassersäule, 37°C für 60 Minuten und Oxygenierung im Medium, das die äußere Oberfläche der Haut umspült.

II.4. Ca-Ionophor A 23187

Bei den Ionophoren handelt es sich um eine Gruppe von Antibiotika mit einem geringen Molekulargewicht von ca. 200 - 300. Diese Substanzen sind in der Lage mit Kationen wie Kalium, Natrium, Kalzium, Magnesium und polaren biogenen Aminen lipidlösliche Komplexe zu bilden. Während die ersten bekannten Iono-

phore noch Stoffwechselprodukte von Mikroorganismen darstellten, wurden inzwischen synthetische Stoffgruppen mit gleichen Eigenschaften entwickelt (Pressman, 1976).

Bei dem in dieser Arbeit verwendeten Ionophor A 23187 handelt es sich um ein Carboxylsäure-Antibiotikum, das von Mikroorganismen der Gattung *Streptomyces chartreusensis* gebildet wird. Die freie Säure hat ein Molekulargewicht von 523 und die Summenformel $C_{23}H_{37}N_3O_6$. Die Struktur des Ionophors ist in Abb. 3 wiedergegeben.

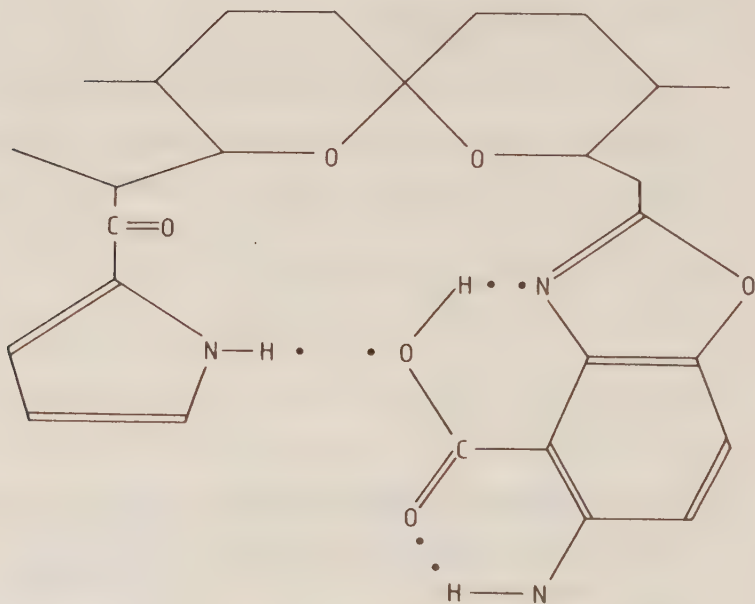


Abb. 3: Chemische Strukturformel des Ca-Ionophors A 23187

Bei physiologischem pH (7,4) vermag A 23187 nur divalente, keine monovalenten Ionen zu binden und von einem wässrigen Milieu in eine organische Phase zu transportieren. Erst im alkalischen pH-Bereich (pH 9,8) werden ebenso - wenn auch nur in vergleichsweise sehr geringem Umfang - Kaliumionen transportiert (Reed und Lardy, 1972).

Durch diese Ionenverschiebungen nimmt A 23187 unter anderem Einfluß auf den ATP-Stoffwechsel in Mitochondrien, eine Erscheinung, auf Grund derer die Ionophore zuerst aufgefallen waren (Pressman, 1974; Reed und Lardy, 1976).

II.5. Natrium-, Wassertransport und Kalzium

Die Tatsache, daß Kalzium-Ionen auf die Stabilität erregbarer Membranen des Nervensystems Einfluß nehmen, ist schon seit 1957 bekannt (Frankenhäuser und Hodgkin, 1957). Erste Hinweise auf eine Beeinflussung der Transportvorgänge an Epithelien ergaben die Beobachtungen von Bentley (1959, 1960) an der Krötenharnblase. Bentley stellte zuerst fest (Bentley, 1959), daß eine Erhöhung der Kalziumkonzentration im Bademedium, das die Innenseite der Harnblase umspült, zu einer Inhibition der durch Gabe von Arginin-Vasopressin (AVP) (1 mU/ml) hervorgerufenen Steigerung des transepithelialen Wassertransports führt. Später (Bentley, 1960) beobachtete er, daß eine Erhöhung der Kalziumkonzentration jedoch keinen Einfluß hatte auf die Aktivierung des trans-

epithelialen Natriumtransports durch AVP. Der dieser Diskrepanz zugrunde liegende Mechanismus wurde jedoch zunächst nicht weiter untersucht.

Für die Froschhaut ergaben die Untersuchungen von Curran und seinen Mitarbeitern (Curran et al., 1961; Curran und Gill, 1962; Curran et al., 1963; Herrera et al., 1963) erste Hinweise für die Beeinflussbarkeit des Natriumtransports durch Kalzium. Nach Zugabe von EDTA, das Kalzium bindet, zum Bademedium der Basalseite der Haut ergab sich eine ausgeprägte Abnahme des trans-epithelialen Potentials bei weniger starker Abnahme des Kurzschlußstroms. Gleichzeitig war eine deutliche Erhöhung der Leitfähigkeit des Epithels feststellbar. Alle diese Effekte konnten durch Zugabe von Kalziumchlorid zum Bademedium wieder kompensiert werden. Aus diesen Ergebnissen zog Curran den Schluß, daß Kalzium einen wichtigen Faktor zur Aufrechterhaltung der spezifischen Ionenpermeabilität der basalen Membran der Froschhaut darstellt. Nur ein Jahr später (Curran und Gill, 1962) stellten diese Autoren fest, daß Kalzium nicht nur auf die basale, sondern auch auf die apikale Membran des Froschhaut-epithels einen wesentlichen Einfluß hat. Erhöhung der Kalziumkonzentration im Bademedium der Außenseite führte in diesen Untersuchungen zu einer sofortigen Erniedrigung des Kurzschlußstromes. Sie erklärten diese Beobachtung mit einer Abnahme der Natrium- (und auch Chlor-) Permeabilität der apikalen Membran des Transportkompartments. Eine solche Permeabilitätsminderung für Natrium hat zwangsläufig eine Abnahme des Natriumtransports zur Folge, da durch die apikale Permeabilitätsabnahme die intrazellu-

läre Natriumkonzentration sinkt und somit das Substrat für die Na-K-Pumpe an der Basalmembran verringert wird. Diese Versuchsergebnisse führten Curran zu der Vermutung, daß Kalzium-Ionen über eine unspezifische Erniedrigung der apikalen Leitfähigkeit den transepithelialen Natriumtransport mitkontrollieren.

Petersen und Edelman (1964) untersuchten in ihrer Arbeit zum ersten Mal eine mögliche Interaktion von Kalziumionen und cAMP an der Krötenharnblase, da kurz zuvor Orloff (Orloff et al., 1962) seine Ergebnisse über die Funktion von cAMP als second messenger von ADH veröffentlicht hatte. Bezüglich der Interaktion von Kalzium und intrazellulärem cAMP entwickelten diese Autoren auf Grund ihrer Beobachtungen ein Modell mit zwei unabhängig voneinander arbeitenden Adenylcyclasesystemen, wobei ein kalziuminsensitives System den transzellulären Natriumtransport regulieren soll, während ein Kalzium-empfindliches System die Permeabilität für Harnstoff und Wasser beeinflussen soll. Auch Argy und Mitarbeiter (1967) waren auf Grund ähnlicher Ergebnisse der Meinung, daß an der Krötenharnblase diese unabhängig voneinander wirkenden cAMP-Pools vorhanden sein müssen.

Bei der Untersuchung der Frage, warum eine Erniedrigung der Natriumkonzentration im Ringer, der die Innenseite der Froschhaut (*Rana pipiens*) umspült, zu einer drastischen Hemmung des transepithelialen Natriumtransports führt, beobachteten Grinstein und Erlj (1978), daß die Hemmung des Natriumtransports an die Anwesenheit von Kalziumionen im Innenbad gebunden war. Weitergehende Untersuchungen über die Aufnahme von radioaktivem Kalzium am isolierten Epithel führten zu der Beobachtung, daß natriumfreie

Inkubationslösungen die Kalziumaufnahme der Epithelzelle über die basale Zellmembran drastisch erhöhen. Die Interpretation ihrer Ergebnisse basierte auf der Vorstellung eines Na-Ca-Austauschmechanismus an der basolateralen Zellmembran der Epithelzelle, ein Konzept, das von Taylor und Windhager (1979) noch detaillierter erörtert wurde.

Wichtig für die weiteren Untersuchungen der Wirkung von Kalziumionen auf den transepithelialen Natriumtransport war die Entdeckung der Ionophore, da diese Stoffe in der Lage sind, Kalziumionen über Zellmembranen zu transportieren und so eine Erhöhung der intrazellulären Kalziumkonzentration bewirken (Reed und Lardy, 1972; Pressman, 1976; Wiesmann et al., 1977).

Wiesmann untersuchte die Wirkung des Ca-Ionophors A 23187 auf den Natriumtransport an der Harnblase (Wiesmann et al., 1977). Die Zugabe von $1 \mu\text{M}$ Ionophor zum Ringer auf der Innenseite der Blase führte nach einem geringgradigen Anstieg des Kurzschlußstromes für 10 - 15 Minuten im weiteren Verlauf zu einer kontinuierlichen Abnahme des Kurzschlußstromes für die nächsten 40 bis 50 Minuten. Die Stimulation des transepithelialen Natriumtransports durch Vasopressin war im Vergleich zur Kontrolle deutlich erniedrigt. Die unter Kontrollbedingungen durch Zugabe von AVP beobachtbare Zunahme der intrazellulären cAMP-Konzentration fand in mit Ionophor behandelten Epithelzellen nicht mehr statt. Exogenes cAMP konnte jedoch seine stimulierende Wirkung auf den Kurzschlußstrom noch entfalten. Aus diesen Beobachtungen zogen die Autoren den Schluß, daß es durch die Erhöhung der intrazellulären Kalziumkonzentration durch den Ca-Ionophor A 23187 zu

einer Inhibition der cAMP-Produktion durch die Adenylcyclase der Zelle sowohl unter Ruhe- als auch stimulierten Bedingungen kommt.

Einen wesentlich anderen Wirkungsmechanismus von Kalzium auf den Natriumtransport an der Harnblase schlugen Taylor und Windhager (1979) vor. Auch sie untersuchten unter anderem die Wirkungen von Ca-Ionophoren und stellten dabei folgendes fest:

- A) Nach Zugabe von Ionophoren (A 23187; X 537 A) auf die Innenseite der Harnblase kommt es zu einer Hemmung des Kurzschlußstroms, die jedoch durch Zugabe von Vasopressin (10 mU/ml) wieder vollständig aufgehoben werden kann (Taylor und Windhager, 1979).
- B) Die gleichen Ergebnisse ergaben sich bei Experimenten mit Quinidin, das die Aktivität von Kalziumionen im Sarkoplasma erhöht (Isaacson und Sandow, 1967; Taylor, 1975).
- C) Die hemmende Wirkung von A 23187 und Quinidin war abhängig von der Kalziumkonzentration im Bademedium.

Daraus zogen die Autoren folgenden Schluß: Gemeinsames Wirkprinzip von Ca-Ionophor und Quinidin ist eine Zunahme des intrazellulären Kalziums und die beobachtbaren Veränderungen sind eine Folge der veränderten Kalziumionenkonzentration.

Sie dachten damit Kalzium eine zentrale Rolle bei der Regulation des Natriumtransports zu und faßten dies zu folgendem Modell zusammen:

Eine Erhöhung der intrazellulären Natriumkonzentration führt durch Erniedrigung des Konzentrationsgradienten für einen Na-Ca-Austausch an der basalen Zellmembran zu einer Erhöhung auch der

intrazellulären Kalziumkonzentration. Diese erhöhte Kalziumkonzentration seinerseits bedingt eine Erniedrigung der Permeabilität der apikalen Zellmembran für Natriumionen, was zu der beobachtbaren Hemmung im Kurzschlußstrom führt.

Da AVP in ihren Versuchen den Ionophor-Effekt vollständig egalisieren konnte, stellten diese Autoren auch die Möglichkeit zur Diskussion, daß AVP neben der Erhöhung der intrazellulären cAMP-Konzentration vielleicht über eine Erniedrigung des zellulären Kalziumspiegels wirken könnte.

Dieses von Taylor und Windhager (1979) und Grinstein und Eriş (1978) vorgeschlagene Modell eines Na-Ca-Austausches an der basolateralen Zellmembran von Epithelzellen konnte durch die Untersuchungen von Chase und Al Awquati bestätigt werden. Diese Autoren waren in der Lage, an Vesikeln aus der gereinigten basolateralen Membran von Epithelzellen der Krötenharnblase die Existenz eines Na-Ca-Austauschers nachzuweisen (Chase und Al Awquati, 1981; Chase, 1984).

Eine Interaktion zwischen Kalzium und cAMP erst im Anschluß an die Produktion von cAMP vermuteten Levine und Mitarbeiter (1981). Sie untersuchten die Wirkung des Phenothiazins Trifluoperazin (TFP), ein Stoff, der spezifisch an das Kalzium bindende Protein Calmodulin bindet und dessen Aktivität hemmt. Der Kalzium-Calmodulin-Komplex seinerseits ist für die Aktivierung einer Vielzahl von Enzymen, wie z.B. der Adenylcyclase und Phosphodiesterase, verantwortlich (Ying Ming Lin, 1982).

10 μ M TFP inhibierte die Stimulation des Wassertransports durch Vasopressin, hatte jedoch keinen Einfluß auf die Wirkung

von Vasopressin auf die Harnstoffpermeabilität und den Natriumtransport. Gleiches gilt für die stimulierende Wirkung von IBMX und cAMP bzw. 8-bromo-cAMP. Da es aber durch TFP weder zu einem Abfall des intrazellulären cAMP noch zu einer Senkung der Aktivität der cAMP-abhängigen Proteinkinase kam, folgerten die Autoren, daß die hauptsächliche Wirkung des Kalzium-Calmodulin-Komplexes in einem Schritt zwischen der Aktivierung der Proteinkinase durch cAMP und den Membranveränderungen liegt, die schließlich zu einer erhöhten Wasserpermeabilität führen.

Im Gegensatz zu den eben dargestellten Untersuchungen an der Krötenharnblase, wo Ca-Ionophore meist einen hemmenden Effekt auf den Kurzschlußstrom entfalten, kommt es bei Inkubation der Froschhaut mit Ca-Ionophor oftmals zu einer Stimulation des Kurzschlußstromes.

Nielsen (1978) beobachtete nach Zugabe von Ca-Ionophor ($4 \mu\text{M}$) auf die Innenseite der Froschhaut (*Rana temporaria*) einen vorübergehenden Anstieg des Kurzschlußstroms. Durch die Erhöhung des intrazellulären Kalzium-Spiegels durch den Ionophor, kommt es seiner Ansicht nach zu einer Erhöhung der Kaliumleitfähigkeit der basalen Zellmembran, was die Steigerung des Kurzschlußstroms erklären könnte.

Eine Stimulation des Kurzschlußstroms nach Gabe von Ca-Ionophor auf die Innenseite der Froschhaut (*Rana catesbeiana*) wurde auch von Balaban und Mandel (1979) beobachtet. Diese Autoren sind jedoch der Meinung, daß eine Erhöhung des freien intra-

zellulären Kalziums einen physiologischen Schritt in der Stimulation des Natriumtransports der Froschhaut durch ADH darstellt. Der erhöhte Kalziumspiegel in der Zelle soll nach dieser Vorstellung zu einer Erhöhung der Natriumpermeabilität der Außenmembran und somit zu einer Steigerung des transzellulären Natriumtransports führen. Dieses Modell steht in direktem Gegensatz zu der bereits dargestellten Hypothese von Taylor und Windhager (1979).

Erlj und seine Mitarbeiter (Erlj et al., 1981) entdeckten bei Experimenten mit den Ca-Ionophoren A 23187 und Inomycin eine Stimulation des Kurzschlußstroms an der Froschhaut und eine Hemmung an der Krötenharnblase bei Inkubation der betreffenden Epithelien mit den genannten Substanzen. Diese Diskrepanz erklärten sie damit, daß in ihren Experimenten durch die Ionophor-Inkubation der Froschhaut und die damit verbundene Erhöhung des intrazellulären Kalziums eine Aktivierung der intrazellulären Prostaglandinsynthese hervorgerufen wurde, meßbar an einer gesteigerten Prostaglandinfreisetzung aus den Epithelzellen. Sie zogen daraus den Schluß, daß die Stimulation des Natriumtransports an der Froschhaut durch Ca-Ionophore durch eine Synthesesteigerung von Prostaglandinen in der Epithelzelle verursacht wird.

Casavola und Svelto (1985) untersuchten die Interaktion von Prostaglandin-Synthetase-Hemmern (Indomethacin) und Ca-Ionophor A 23187 an der Froschhaut. Sie stellten dabei fest, daß der Ionophor an zuvor mit Indomethacin behandelten Häuten keinerlei

stimulierenden Effekt mehr auf den Natriumtransport bewirken konnte. Andererseits hatte Hydrocortison, das an anderer Stelle als Indomethacin die Prostaglandinsynthese hemmt, keinerlei Effekt auf die durch A 23187 hervorgerufene kurzzeitige Stimulation des Kurzschlußstromes. Daraus folgerten die Untersucher, daß der Ionophor über eine Erhöhung des intrazellulären Kalziums mit der Prostaglandin-Synthetase interferiert und über eine Steigerung der intrazellulären Prostaglandinsynthese die apikale Leitfähigkeit an der Froschhaut erhöht.

Die Wirkung von A 23187 auf die cAMP-Konzentrationen in der Froschhaut von *Rana temporaria* untersuchten Johnsen und Nielsen (1978). Sie stellten dabei fest, daß der Ionophor ($4 \mu\text{M}$ auf die Innenseite) nicht zu einer Erhöhung der cAMP-Konzentration in den Zellen führt. Da sie jedoch schon zuvor (Nielsen, 1978) die Steigerung des Kurzschlußstroms durch Ionophor beobachtet hatten, zogen sie daraus den Schluß, daß die Aktivierung des Kurzschlußstroms durch A 23187 nicht cAMP-induziert ist bzw. daß eine Erhöhung der intrazellulären cAMP-Spiegel nicht generell notwendige Voraussetzung für eine Steigerung des Kurzschlußstroms durch A 23187 ist. Ein weiterer Versuch zur Untersuchung der Zusammenhänge von Kalziumionen und Natriumtransport an der Froschhaut (von *Rana esculenta*) bestand in der Inkubation der Innenseite des isolierten Epithels mit Kalzium-freiem Ringer mit EDTA. Johnsen und Nielsen (1982) stellten dabei eine drastische Erhöhung der Sensitivität gegenüber ADH sowohl für die cAMP Produktion als auch für die Stimulation des Kurzschlußstroms fest. Die Autoren zogen aus ihren Versuchen folgende Schlüsse:

1. Durch die Kalzium-freie Inkubation für mindestens 60 Minuten kommt es zu einer Abnahme des intrazellulären Kalziums.
2. Folge davon ist die erhöhte ADH-Sensitivität der Adenylcyclase, die ansonsten unter stimulierten Bedingungen durch Kalzium in ihrer Aktivität inhibiert wird (siehe auch Wiesmann et al., 1977).

II.6. Bisherige cAMP-Bestimmungen an der Froschhaut

Hall et al., 1976

In dieser Arbeit werden zum ersten Mal unter anderem Ergebnisse über die Messung von cAMP in der Froschhaut dargestellt. Allerdings wurden die Messungen nicht am isolierten Epithel, sondern an Homogenaten der Gesamthaut durchgeführt. Untersucht wurden u.a. die Wirkungen von Prostaglandin E_1 , Indomethacin und Theophyllin auf die intrazellulären cAMP-Konzentrationen. Die wesentlichen Ergebnisse waren:

1. Prostaglandin E_1 (PGE_1) induzierte einen Anstieg des intrapithelialen cAMP-Spiegels.
2. Indomethacin (6×10^{-6} M) hatte auf den cAMP-Gehalt der Froschhaut einen biphasischen Effekt: Einem initialen Anstieg folgte ein Abfall des cAMP. Zudem verstärkte Indomethacin die durch PGE_1 verursachte cAMP-Erhöhung.
3. Auch Theophyllin erhöhte die cAMP-Konzentration und verstärkte den PGE_1 -Effekt.

Hall beobachtete außerdem einen deutlichen Unterschied zwischen Winter- und Sommerfröschen. Sowohl der basale cAMP-Gehalt in Häuten von Winterfröschen als auch deren Reaktion auf PGE_1 waren gegenüber im Sommer gefangenen Frösche deutlich erhöht.

Schorderet et al., 1975; 1978

Diese Arbeiten beschäftigen sich ausschließlich mit der Messung intraepithelialer cAMP-Konzentrationen am isolierten Epithel der Froschhaut von *Rana ridibunda* unter verschiedenen experimentellen Bedingungen:

1. Die PDE-Inhibitoren Theophyllin, IBMX und Papaverin erhöhten die cAMP-Konzentration in den Epithelzellen, wobei Theophyllin die stärkste Wirkung entfaltete.
2. Eine Vielzahl von adrenerg wirksamen Substanzen (Isoproterenol, Noradrenalin, Adrenalin, Dopamin, Phenylephrin) verursachten ebenfalls eine Erhöhung der epithelialen cAMP-Konzentration.
3. Gleiches gilt für Oxytocin, allerdings entfaltete dieses Hormon seine Wirkung nur in Anwesenheit von Theophyllin.
4. Durch β -Blocker (Propranolol) konnte die cAMP-Erhöhung durch Isoproterenol verhindert werden, nicht jedoch die Wirkung von Oxytocin.
5. Da zudem Isoproterenol und Oxytocin einen synergistischen Effekt in Bezug auf den cAMP-Gehalt der Zellen des Epithels aufwiesen, vermuteten die Autoren voneinander unabhängige Rezeptoren für Catecholamine und Hormone der Neurohypophyse.

Johnsen und Nielsen 1978; 1982

In der früheren Veröffentlichung (1978) stellten die Autoren die Effekte von ADH, Argininvasotocin (AVT), Theophyllin, Filipin und A 23187 auf den cAMP-Gehalt im isolierten Epithel der Froschhaut von *Rana temporaria* dar. Wie auch bei den anderen Untersuchern findet sich bei Zugabe der Hormone der Neurohypophyse (ADH) bzw. deren Analoga (AVT) und Theophyllin eine Erhöhung der intrazellulären cAMP-Konzentration. Das Antibiotikum Filipin, das entsprechend Versuchen dieser Autoren in der Lage ist, den Kurzschlußstrom der Froschhaut zu stimulieren, entfaltet keinerlei Wirkung auf die cAMP-Konzentration in den Epithelzellen; der Ionophor A 23187 erhöht - allerdings nur in Anwesenheit von Theophyllin - die zellulären cAMP-Werte.

Wichtig sind desweiteren folgende zwei Ergebnisse:

1. Nach Zugabe der Hormone zu den Ringerlösungen, in denen die Epithelien inkubiert wurden, kam es sehr rasch zu einem Anstieg der intrazellulären cAMP-Konzentration, die 3 - 5 Minuten nach Zugabe der Substanz ein Maximum erreichte und anschließend langsam abfiel, um nach etwa 1 Stunde wieder annähernd Kontrollwerte zu erreichen.
2. cAMP ist entsprechend den Ergebnissen dieser Arbeiten in allen Zellagen des Froschhautepithels gleichmäßig verteilt, sowohl unter Kontroll- als auch unter stimulierten Bedingungen.

III. Methode

III.1. Tiermaterial

Die Versuche wurden an der isolierten Froschhaut von *Rana temporaria* durchgeführt. Die Tiere wurden zu allen Jahreszeiten gefangen und bis zu ihrer Verwendung in einem Plastikbecken mit freiem Zugang zu fließendem Leitungswasser gehalten. Für die Versuche wurden sowohl weibliche als auch männliche Exemplare verwendet.

III.2. Präparation

Die Tiere wurden durch Dekapitieren und anschließendes Sondieren des Rückenmarks getötet und sofort mit Froschringerlösung abgespült. Danach wurde unter ständiger Befeuchtung mit Ringerlösung die Haut der Frösche mit Pinzette und Schere abpräpariert, wobei eine Verletzung oder Quetschung der Haut vermieden wurde. Im Anschluß daran wurde die Bauchhaut entsprechend Abb. 4 für die weitere experimentelle Bearbeitung folgendermaßen aufgeteilt: Das asymmetrische Teil vom Kopfbereich diente der Messung des Kurzschlußstroms, die restliche Bauchhaut den Experimenten zur Messung der intrazellulären cAMP-Konzentration.

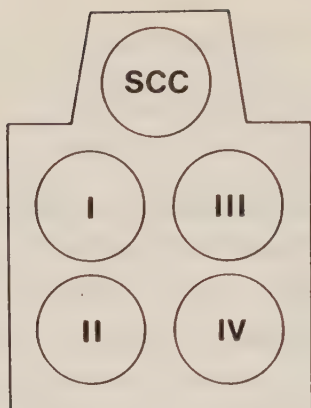


Abb. 4: Schematische Darstellung der Aufteilung der Froschhaut für die Experimente.

SCC = Hautstück zur Messung des Kurzschlußstroms,

I - IV = Hautstücke für die cAMP-Messungen.

III.3. Gewinnung des Zellextraktes

Die einzelnen Hautstücke wurden unter unterschiedlichen Bedingungen inkubiert, wobei mit Ausnahme einer Versuchsserie die jeweils entsprechenden seitensymmetrischen Stücke als Kontrolle dienten. Zur leichteren Handhabung wurden die Hautstücke mit feinen Nadeln auf Kartonringe aufgespannt, wobei pro Hauthälfte zwei Ringe bespannt werden konnten (siehe Abb. 4). Die Ringe, die auf der Innenseite der Haut zu liegen kamen, hatten einen Innendurchmesser von 25 mm, sodaß die dem Inkubationsmedium exponierte und anschließend weiterverarbeitete Fläche ca. $4,9 \text{ cm}^2$ betrug. Um vor Beginn des eigentlichen Versuchs Gleichgewichtsbedingungen zu erreichen, wurden die Hautstücke für 90 - 120 Minuten bei Zimmertemperatur in Froschringerlösung inkubiert.

Im Anschluß daran erfolgte die Inkubation mit den zu untersuchenden Substanzen. Dazu wurden die Ringe in 100 ml frischen Ringer überführt, dem die Pharmaka in den entsprechenden Konzen-

trationen beigemischt worden waren. Nach Beendigung der Inkubation wurden die Versuchshäute aus dem Medium entfernt, auf der Epithelseite mit einem Saugtupfer kurz abgetrocknet und durch Eintauchen in flüssigen Stickstoff (-196°C) rasch tiefgefroren. Die Zeitspanne von der Entnahme aus der Ringerlösung bis zum Eintauchen in Stickstoff betrug maximal 10 Sekunden. Zur Gewinnung der für die cAMP-Bestimmung notwendigen Epithelzellen wurden die Hautstücke einzeln in eine mit flüssigem Stickstoff gefüllte Petrischale überführt. In dieser Petrischale wurden mit Hilfe eines Skalpells die Epithelzellen der Froschhaut abgekratzt, wobei ein zu kräftiges Schaben und damit eine Miterfassung des darunterliegenden Bindegewebes vermieden wurde. Die in flüssigem Stickstoff in der Petrischale schwimmenden Epithelbruchstücke wurden danach auf drei verschiedene Arten weiterverarbeitet, um eine für Zellaufschluß und -extraktion optimale Technik zu erarbeiten.

1. Die Epithelteile wurden in vorgekühlte Reaktionsgefäße (Eppendorf Reaktionsgefäße, 1,5 ml) überführt und der noch vorhandene flüssige Stickstoff mit einem Metallstab, der etwas wärmer war (-150°C), verdampft.

Nach diesem gemeinsamen Schritt wurden zwei verschiedene Extraktionsverfahren getestet:

- a) Die Epithelteile wurden in ein Reagenzgefäß mit kochendem bidestilliertem Wasser (500 μl) geworfen, dessen pH durch Zugabe eines Phosphatpuffers (pH 7,0) auf einen neutralen Wert justiert war. Die Reaktionsgefäße wurden anschließend verschlossen und für 10 Minuten im Wasser-

bad bei Siedetemperatur gehalten.

- b) Die gefrorenen Epithelteile wurden in den Reagenzgefäßen bei -80°C und 10^{-6} Torr gefriergetrocknet (Gefriertrocknungsanlage Pfeiffer, TCP 100). Vor der Herausnahme aus dem Vakuum wurden die Präparate etwas über Zimmertemperatur erwärmt um eine Rehydratation zu vermeiden. Nach Entnahme der Reaktionsgefäße aus der Gefriertrocknungsanlage erfolgte die sofortige Zugabe von $500\ \mu\text{l}$ 100°C heißem bidestilliertem Wasser mit pH 7,0 (siehe unter a). Nach Verschluß der Gefäße wurden diese wiederum für 10 Minuten im kochenden Wasserbad gehalten.

2. Die im flüssigen Stickstoff schwimmenden Epithelteile wurden in Stickstoff gefüllte Aluschälchen überführt, deren Form in etwa denen der Reagenzgefäße entsprach. Die Schälchen waren zuvor aus Alufolie geformt worden. Nach Verdampfen des flüssigen Stickstoffs wurden die Aluschälchen für 3 Minuten in auf 110°C erwärmte Metallblöcke gesteckt, die Bohrungen zur Aufnahme der Aluschälchen enthielten. Danach wurde die Spitze der Aluschälchen, worin sich die erhitzten Zelltrümmer befanden, abgeschnitten und in $500\ \mu\text{l}$ kochendes Bidest (pH 7,0) geworfen, welches sich seinerseits in einem Reagenzgefäß in einem siedenden Wasserbad befand. Nach Verschluß der Reagenzgefäße erfolgte die 10-minütige Inkubation im Wasserbad, die Aluminiumfolie wurde im Anschluß daran mit einer Pinzette entfernt.

Die weitere Verarbeitung der so gewonnen Zellextrakte erfolgte einheitlich: Nachdem die Reaktionsgefäße aus dem Wasserbad entfernt worden waren, wurden sie bei 9900 g 10 Minuten lang zentrifugiert. Der Niederschlag wurde zur Bestimmung des Trockengewichts herangezogen, der Überstand abpipettiert und wie folgt aufgeteilt:

- 100 μ l dienten der Bestimmung der Kaliumkonzentration im zellfreien Überstand.
- In den restlichen 400 μ l erfolgte die Messung von cAMP.

Da sich bei den Experimenten mit AVP keine signifikanten Unterschiede in den Ergebnissen der auf die verschiedenen Arten gewonnenen Zellextrakte zeigten, wurde bei den übrigen experimentellen Bedingungen der Zellaufschluß - wie unter 1a) beschrieben - durch alleiniges Überführen der gefrorenen Zellteile in kochendes Wasser durchgeführt, da dies die praktikabelste und schnellste Form des Zellaufschlusses darstellte.

III.4. Weiterverarbeitung des Zellextraktes

Im Anschluß an die oben beschriebene Präparation zur Gewinnung intrazellulärer Bestandteile aus den Epithelzellen folgten je nach Versuchsbedingungen weitere Schritte:

III.4.1. Reinigungsverfahren

Um bei der Bestimmung des cAMP-Spiegels störende Substanzen aus dem Zellextrakt zu eliminieren, wurden folgende, von anderen Autoren (Johnsen und Nielsen, 1978; Schorderet et al., 1978) bereits verwendete Reinigungsschritte getestet.

a) Reinigung mit Aluminiumoxid (Al_2O_3) und Lyophilisierung
(Ramachandran, 1971)

Hierbei wurden die 400 μl Extrakt auf eine Säule von Al_2O_3 (neutrale Form für Säulenchromatographie, Aktivitätsstufe I, Korngröße 0,063 - 0,200 mm, Fa. Merck) von einer Höhe von 6 cm und einem Durchmesser von 0,5 cm in einer Pasteurpipette aufgetragen und anschließend mit 2 ml Tris-HCl-Puffer, pH 7,4, ausgewaschen. Das ausgewaschene Volumen wurde in einem Reagenzgefäß aufgefangen, eingefroren und anschließend lyophilisiert. Die nach der Lyophilisierung im Reagenzgefäß zurückgebliebenen Substanzen wurden in 400 μl Na-Acetat-Puffer, pH 4,0 wieder aufgenommen und die cAMP-Bestimmung durchgeführt.

b) Reinigung mit Bariumhydroxid ($\text{Ba}(\text{OH})_2$) und Zinksulfat (ZnSO_4)
(Krishna et al., 1968)

Bei diesem Reinigungsverfahren wurden zu den 400 μl Zellhomogenat jeweils 40 μl Zinksulfat- (0,25 M) und Bariumhydroxid- (0,25 M) Lösung zugegeben, gemischt und der Niederschlag 3 Minuten bei 9900 g zentrifugiert. Der Überstand wurde abpipettiert

und mit ihm die Barium-Zink-Präzipitation ein weiteres Mal in der gleichen Form wiederholt. Die cAMP-Bestimmung erfolgte dann in dem nach nochmaliger Zentrifugation gewonnen Überstand. Der durch die Zugabe der beiden Lösungen verursachte Verdünnungseffekt wurde bei der Auswertung berücksichtigt.

III.4.2. Entfernung von cAMP aus dem Epithelzellextrakt

Für bestimmte Fragestellungen war es erforderlich, cAMP aus dem Extrakt zu entfernen. Dazu wurden zwei verschiedene Verfahren angewendet:

a) Behandlung mit Phosphodiesterase (PDE)

Das Enzym PDE ist in der Zelle für den Umbau von cAMP zu 5-AMP und damit für dessen Inaktivierung verantwortlich. Um cAMP aus dem Zellextrakt zu entfernen, wurden deshalb 125 mU PDE zugegeben, was einem Volumen von 50 µl einer PDE-Lösung entsprach. Die Lösung besteht aus 50 % Glycerin, 50 mmol/l Tris-HCl, 50 mmol/l Magnesiumsulfat, pH 7,0. Die PDE ist aus Rinderherz gewonnen und hat eine spezifische Aktivität von 0,25 U/mg (= 250 mU/100 µl Lösung), wobei 150 mU PDE bei 37°C in 30 Minuten ca. 25 pmol cAMP hydrolisieren (Angaben von Fa. Boehringer, Mannheim). Der gesamte Ansatz wurde für 30 Minuten in einem Wasserbad bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde die PDE durch Erhitzen in einem Wasserbad auf Siedetemperatur denaturiert und abzentrifugiert. Im Überstand wurde die cAMP-Bestimmung vorgenommen. Der durch die Zugabe der PDE-Lösung entstandene Verdünnungseffekt wurde bei der Aus-

wertung berücksichtigt.

b) Behandlung mit Aktivkohle

cAMP kann auch durch Aktivkohle aus dem Medium entfernt werden (Angaben von Fa. Boehringer, Mannheim; Brown et al., 1971). Zu den 400 μ l Zellextrakt wurden ca. 130 mg Aktivkohle (gekörnt, 1,5 mm, Fa. Merck) zugegeben und unter regelmäßigem Schütteln 20 Minuten bei Zimmertemperatur inkubiert. Nachdem sich ein Großteil der Aktivkohle am Boden des Reaktionsgefäßes abgesetzt hatte, wurde der Zellextrakt vorsichtig abpipettiert und cAMP bestimmt.

Bei beiden soeben beschriebenen Schritten zur Elimination des cAMP schloß sich zuweilen in Abhängigkeit von der Fragestellung noch einer der zuvor beschriebenen Reinigungsschritte an.

III.5. Bestimmung von cAMP

Die quantitative Bestimmung der aus den Epithelzellextrakten der Froschhäute gewonnenen cAMP-Spiegel erfolgte nach dem Prinzip eines Protein-Bindungs-Tests mit Hilfe eines Testansatzes der Fa. Boehringer/Mannheim (Radioisotopen-Verdünnungstest mit cAMP-bindendem Protein; Ammoniumsulfat-Fällungstechnik). Wesentliche Grundlage dieses Tests war eine Proteinkinase, die cAMP bindet, wobei radioaktiv markiertes und nicht markiertes cAMP kompetitiv um die Bindungsstelle am Protein kämpfen. Um eine quantitative

Aussage über den Gehalt an cAMP im Zellextrakt machen zu können, war es nötig, eine Eichgerade zu erstellen.

Der gesamte Test setzte sich aus folgenden Lösungen zusammen:

1. 0,2 M Natrium-Acetat-Puffer, pH 4
2. 200 nM cAMP
3. 40 nM ^3H -cAMP (ca. 25 Ci/mmol)
4. Lösung mit γ -Globulin, wobei 1 ml Lösung 22,5 mg γ -Globulin enthält
5. Lösung mit dem cAMP-bindenden-Protein und γ -Globulin, wobei 1 ml dieser Lösung Bindungsprotein für 50 Tests und 22,5 mg γ -Globulin enthält
6. 3,8 M Ammoniumsulfatlösung $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$
7. 2,7 M Ammoniumsulfatlösung

Der Bestimmungsansatz erfolgte entsprechend dem in Tab. 1 dargestellten Schema.

Die Lösungen wurden in der angegebenen Reihenfolge jeweils in Reagenzgefäße pipettiert und für 100 Minuten im Eisbad inkubiert. Die Zugabe von 500 μl eiskalter 3,8 M Ammoniumsulfatlösung beendete die Inkubation und nach weiteren 10 Minuten, währenddessen die Proben sich wiederum im Eisbad befanden, wurde 4 Minuten bei 9900 g abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, zum Niederschlag weitere 500 μl 2,7 M Ammoniumsulfatlösung zugegeben und 5 Minuten im Eisbad gehalten. Nach anschließender zweiminütiger Zentrifugation bei 9900 g wurde der Überstand quantitativ entfernt und der Niederschlag in 1200 μl Wasser aufgelöst. 1 ml dieser Lösung wurde anschließend in 10 ml Szintillationslösung

	Leerwert	Null- standard	Eichgerade			Probe
			2 pmol	4 pmol	10 pmol	20 pmol
Acetat-Puffer = Lösung 1	50 μ l	50 μ l	50 μ l	50 μ l	50 μ l	50 μ l
cAMP = Lösung 2			10 μ l	20 μ l	50 μ l	100 μ l
^3H -cAMP = Lösung 3	20 μ l	20 μ l	20 μ l	20 μ l	20 μ l	20 μ l
γ -Globulin = Lösung 4	20 μ l					
Probe						100 μ l
H ₂ O	110 μ l	110 μ l	100 μ l	90 μ l	60 μ l	10 μ l
cAMP-bind. Prot. = Lösung 5		20 μ l	20 μ l	20 μ l	20 μ l	20 μ l

Tab. 1: Bestimmungsansatz für die Messung intrazellulärer cAMP-Konzentrationen.

(Unisolve der Fa. Zinsser, Frankfurt) gegeben und die Radioaktivität in einem Gerät der Fa. Beckman (LS 8000 Series, Liquid Scintillation Systems) gemessen. Zur genaueren Bestimmung wurden pro Probe jeweils zwei Meßansätze hergestellt. Die Messung der Radioaktivität erfolgte für jeweils 2×10 Minuten auf zwei unabhängigen ^3H -sensitiven Kanälen. Somit ergaben sich pro Probe 4 Zählraten, aufgrund der Doppelbestimmungen also 8 Zählraten pro Versuchsbedingung. Für die Auswertung wurde jeweils der Mittelwert aus allen 8 Zählraten herangezogen.

Insgesamt ergaben sich aus der Bestimmung somit folgende Zählwerte I (= Impulse/min):

I_L = I des Leerwertes (kein cAMP-bindendes Protein im Testansatz), um den alle anderen Zählraten korrigiert werden müssen

I_o = I des Nullstandards (kein kaltes cAMP im Testansatz)

I_x = I des Standards bzw. der Probe

Zur Erstellung der Eichgeraden und zur Bestimmung des cAMP-Gehalts der Proben wurde nun jeweils der Quotient I_o/I_x gebildet. Damit ergaben sich mit Hilfe der 4 Werte des Standards vier Punkte (für 2, 4, 10 und 20 pmol cAMP), die zu einer Eichgeraden vereinigt werden konnten. Die Bestimmung des cAMP-Gehalts der Probe erfolgte nun durch Projektion des Quotienten I_o/I_{Probe} auf die Eichgerade. Um jedoch eine möglichst exakte Bestimmung zu ermöglichen wurde dieses optische Berechnungssystem mit Hilfe eines Computers in ein mathematisches übertragen:

Die Eichgerade kann entsprechend der mathematischen Darstellung von Geraden wie folgt definiert werden:

$$y = ax + b$$

Hierbei gilt im vorliegenden Fall:

$$y = I_0 / I_x$$

I_0 = Zählrate des Nullstandards,

I_x = Zählrate der betreffenden Probe,

beide Werte jeweils korrigiert um den Leerwert.

a = Steigung der Geraden im Punkt x , wobei

x = Menge an vorhandenem cAMP

b = Abstand der Geraden zur x -Achse, in diesem Fall = 1, da für den Fall, daß in der Probe sich kein cAMP befindet, gilt:

$$I_0 = I_x \Rightarrow I_0 / I_x = 1$$

Somit läßt sich für die 4 Punkte der Eichgeraden (2, 4, 10 und 20 pmol cAMP im Testansatz) jeweils die Steigung a berechnen. Für die weiteren Bestimmungen des cAMP-Gehalts in den Proben wurde nun der Mittelwert der Steigung a in den 4 Punkten der Eichgerade herangezogen.

Dieses Verfahren konnte angewendet werden, da die Eichgerade in allen Fällen linear war.

III.6. Messung des Kurzschlußstroms (SCC)

Wie bereits angeführt (Abb. 4), wurde das asymmetrische Kopfstück der Bauchhaut zur Messung des Kurzschlußstroms herangezogen. Die Inkubation des Hautstücks wurde in Plexiglaskammern durchgeführt, die mit Strom- und Spannungselektroden ausgerüstet waren (Ussing-Kammern). Das Hautstück wurde hierzu mit Hilfe eines Cyanoacrylat-Klebers (Bindulin 2000) mit der Epithelseite auf einen Teflonring geklebt. Auf die Hautinnenseite wurde ein Plexiglasring gelegt, der zur Hautseite hin mit einem o-Ring versehen war. Diese beiden Ringe wurden mit der dazwischenliegenden Haut in die beiden Halbkammern eingesetzt. Die Abdichtung zwischen Ringen und Kammerhälften erfolgte wiederum durch o-Ringe, die exponierte Fläche betrug $1,6 \text{ cm}^2$ (siehe Abb. 5 und 6).

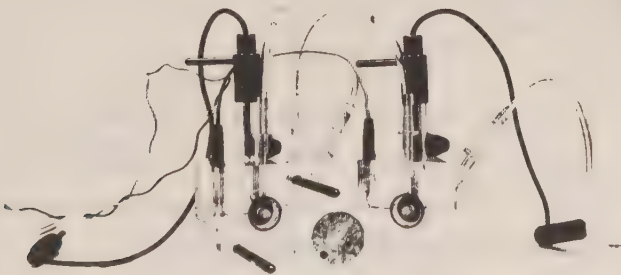


Abb. 5: Inkubationskammer in geöffnetem Zustand. Die zwischen 2 Ringe eingespannte Froschhaut wird während des Versuchs zwischen die beiden Kammerhälften eingesetzt.

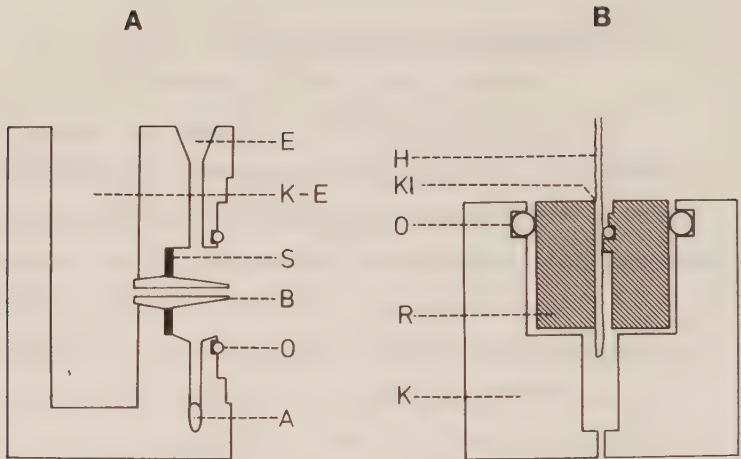


Abb. 6: Schnittbild durch eine Inkubationskammerhälfte (A) und vergrößertes Schnittbild der Befestigung der Haut zwischen den Ringen (B). E = Einlaß; K-E = Bohrung zur Aufnahme der Kalomelelektrode; S = Silberplatte; B = Agar-Brücke; O = O-Ring; A = Auslaß; H = Haut; Kl = Klebstoff; R = Ring; K = Kammer.

Die beiden Kammerhälften wurden mit Hilfe von Rollerpumpen getrennt voneinander perfundiert. Das Volumen in einer Kammerhälfte betrug 2 ml und wurde bei normaler Perfusionsrate in 30 Sekunden vollständig ausgetauscht.

Das Hautpotential wurde in etwa 1 mm Abstand von den Hautoberflächen durch Ringer-Agar-gefüllte Flüssigkeitsbrücken gemessen, die mit Kalomelelektroden in den Halbkammern in Verbindung standen. Als Stromelektroden dienten chlorierte Silberplatten, die an den Rückwänden der Halbkammern eingelassen waren.

Abb. 7 gibt das Funktionsdiagramm der elektronischen Schaltung wieder, mit deren Hilfe die elektrischen Funktionsparameter der Haut wie Potentialdifferenz, Kurzschlußstrom und Hautwiderstand gemessen wurden. Vor den Versuchen wurde die Differenz der Eigenpotentiale der Elektroden auf 0 kompensiert. Der Eingangswiderstand der Automaten war größer 10^9 Ohm. Die Häute wurden zur Messung des Kurzschlußstroms in kurzgeschlossenem Zustand inkubiert, d.h. das Hautpotential wurde mit Hilfe der Automaten auf 0 mV kompensiert. Allerdings konnte das Hautpotential selbst auch abgelesen werden.

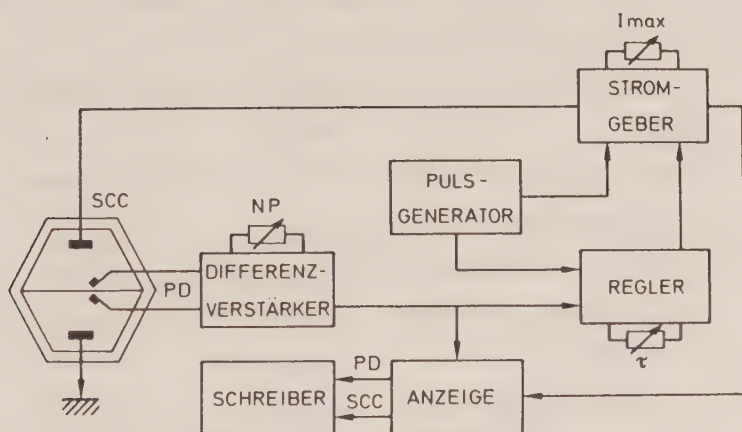


Abb. 7: Blockschaltbild des Kurzschlußstromautomaten: PD = Potentialdifferenz; SCC = Kurzschlußstrom; NP = Nullpunkt-ableich; $I_{\max}$ = Strombegrenzung; τ = Zeitkonstante

Die Zeitkonstante der Stromkompensation betrug üblicherweise 100 msec. Der Hautwiderstand wurde durch 10 mV Testpulse von 1 sec Dauer bestimmt und der gemessene Kurzschlußstrom wurde fortlaufend auf Schreibern (Kompensationsschreiber Servogor der Fa. Metrawatt) registriert.

III.7. Verwendete Lösungen und Inkubationsbedingungen

Sämtliche Inkubationen und Versuche erfolgten in Froschringerlösung mit folgender Zusammensetzung (Angaben in mmol/l):

110 NaCl, 2,5 KHCO₃, 1,0 CaCl₂.

Der pH-Wert der mit Luft equilibrierten Lösungen lag zwischen pH 7,9 und 8,2.

Die Inkubation mit den getesteten Substanzen erfolgte wie folgt:

Arginin-Vasopressin (AVP)	150 mU/ml	5 Minuten
(Fa. Ferring, Kiel)		
3-Isobutyl-1-methylxanthin (IBMX)	10 ⁻⁵ M	5 Minuten
(Fa. Ega Chemie, Steinheim)		
Ca-Ionophor A 23187	3 µM	60 Minuten
(Fa. Calbiochem-Behring)		
Phosphodiesterase (PDE)	278 mU/ml	30 Minuten
(Fa. Boehringer, Mannheim)		(37°C)

III.8. Experimente unter Verwendung von Ca-Ionophor A 23187

Bei den Experimenten mit Ca-Ionophor A 23187 wurde die Inkubation wie folgt abgeändert:

Jedes der Hautstücke wurde inidividuell unter folgenden Bedingungen getestet, sodaß in diesen Fällen eine entsprechende seitensymmetrische Kontrolle entfallen mußte:

Hautstück 1: 60 Minuten in 100 ml Ringer mit 30 μ l DMSO

Hautstück 2: 60 Minuten in 100 ml Ringer mit 30 μ l DMSO

+ 5 Minuten in 150 mU/ml AVP

Hautstück 3: 60 Minuten in 100 ml Ringer mit 3 μ M

Ionophor A 23187

+ 5 Minuten in 150 mU/ml AVP

Hautstück 4: 60 Minuten in 100 ml Ringer mit 3 μ M

Ionophor A 23187

+ 5 Minuten in 150 mU/ml AVP + 10^{-5} IBMX

In einer weiteren Versuchserie mit A 23187 wurden die Hautstücke wie folgt inkubiert:

Hautstück I: 60 Minuten in 100 ml Ringer mit 3 μ M Ionophor A 23187

Hautstück II: 60 Minuten in 100 ml Ringer mit 3 μ M Ionophor A 23187

+ 5 Minuten 10^{-5} M IBMX

Da der Ionophor in DMSO gelöst war, wurde auch zu den Inkubationsmedien der Epithelien, die nicht mit Ca-Ionophor inkubiert

wurden, DMSO in gleicher Menge zugegeben.

Der bei der anschließenden Epithelpräparation gewonnene Zell-extrakt (500 μl) wurde in dieser Versuchsreihe entsprechend Abb. 8 weiterverarbeitet.

In 100 μl des Zellextrakts wurde wie üblich die Kaliumkonzentration bestimmt. In weiteren 200 μl erfolgte die Messung des cAMP-Gehalts. Die restlichen 200 μl wurden noch zusätzlich mit 725 mU/ml (30 Minuten, 37°C) PDE behandelt und im Anschluß daran erfolgte die cAMP-Messung.

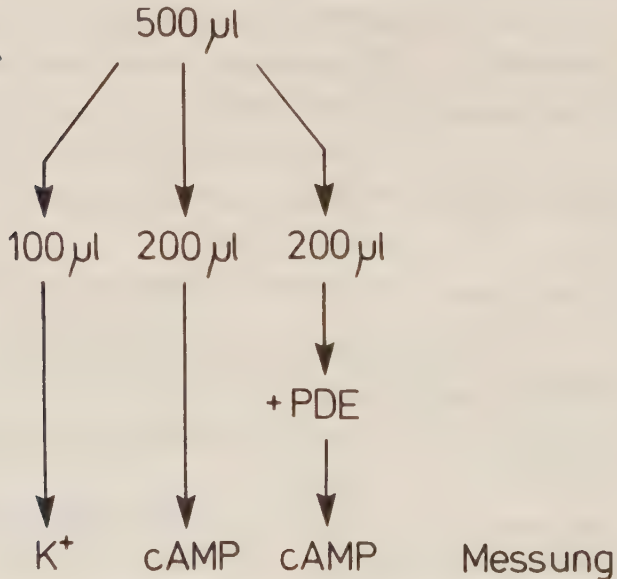


Abb. 8: Schema der Aufteilung des Zellextrakts aus einem Epithelstück zur Bestimmung der K^+ - und cAMP-Konzentration bei den Versuchen mit Ca-Ionophor

Diese Aufteilung wurde vorgenommen um den PDE-empfindlichen Anteil des cAMP-Gehalts zu ermitteln, welcher sich aus der Differenz des cAMP-Gehalts der unbehandelten abzüglich des cAMP-Gehalts der PDE-inkubierten Probe ergab.

III.9. Kaliumbestimmung zur Zellmengenstandardisierung

Um ein Maß für die Zellmenge zu erhalten, die bei der Präparation erfaßt wurde, wurde in allen Zellextrakten die Kaliumkonzentration mit Hilfe eines Atomabsorptionsspektrometers (SP 9 atomic absorption spectrophotometer v. Fa. Philips) ermittelt. Dazu wurden Proben von 50 µl (Standardlösungen mit 0, 2,5 und 5 mmol/l K⁺ bzw. Zellextrakt) in 20 ml Lithiumstandard gelöst und die jeweilige Kaliumkonzentration im Zellextrakt (in mmol/l) bestimmt. Pro Versuchsbedingung wurde eine Doppelbestimmung durchgeführt.

Die erhaltenen cAMP-Werte (in pmol/100 µl Extrakt) wurden durch die erhaltenen Kaliumkonzentrationen (in mmol/l) dividiert. Unter Berücksichtigung des Probevolumens zur cAMP-Messung (100 µl) ergab sich somit eine Konzentrationsangabe in

$$\frac{\text{pmol cAMP}}{100 \text{ nmol Kalium}}$$

III.10. Bestimmung der Trockengewichte

Die Trockengewichtsbestimmung wurde an dem nach der Zentrifugation des Zellhomogenats gewonnenen Niederschlag durchgeführt. Dieser Niederschlag wurde im Reagenzgefäß für 2 Stunden bei 85°C getrocknet und zusammen mit dem Reaktionsgefäß gewogen. Anschließend wurde das Reagenzgefäß gesäubert, wiederum getrocknet und das jeweilige Eigengewicht des Gefäßes bestimmt. Die Differenz aus beiden Messungen ergab das Trockengewicht des Zelniederschlags.

III.11. Statistik

Die Ergebnisse sind als Mittelwerte (MW) $\pm$ Standardabweichung (SD) angegeben. Statistische Analysen wurden nach dem Student t-Test für gepaarte oder ungepaarte Werte durchgeführt.

IV. Ergebnisse

IV.1. Erstellung der Eichgeraden

Wie im Kapitel "Methodik" bereits erläutert, ist zur quantitativen Bestimmung des cAMP-Gehalts in den gewonnenen Zellextraktionen die Erstellung einer Eichgeraden notwendig. Die in Abb. 9 dargestellte Eichgerade ist eine Zusammenfassung von insgesamt elf unabhängig voneinander erstellten Geraden.

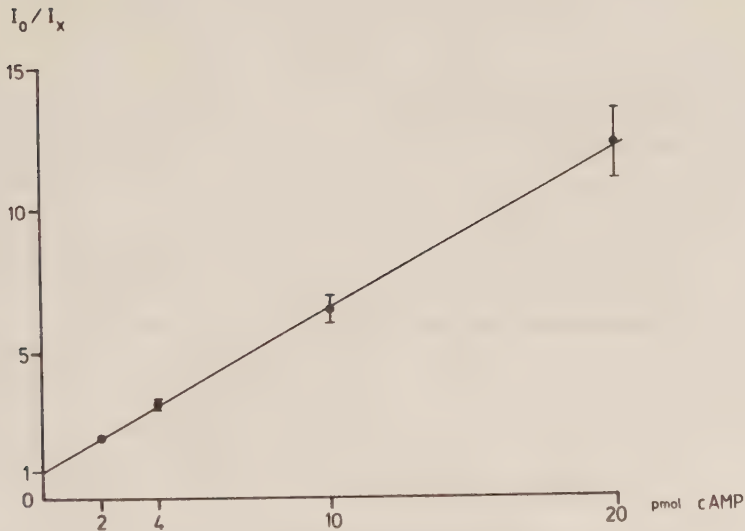


Abb. 9: Eichgerade zur Bestimmung des cAMP-Gehalts im Zellextrakt. I_0 = Zählrate des Nullstandards; I_x = Zählrate des jeweiligen Standards mit 2, 4, 10 oder 20 pmol cAMP.

Die Eichgeraden waren sehr gut reproduzierbar. Die fünf Eichpunkte liegen praktisch auf einer Geraden. Auch die Standardabweichungen innerhalb der einzelnen Meßpunkte waren sehr gering. Wie aus Tab. 2 ersichtlich ist, beträgt die für unseren Hauptmeßbereich von 0 bis 4 pmol cAMP errechnete Standardabweichung nur maximal 5,5 % des Quotienten I_0/I_x . Der Steigungskoeffizient für die Eichgerade weist ebenfalls eine nur geringe Schwankungsbreite auf. Es ergab sich ein Wert von $0,53 \pm 0,03$ / pmol cAMP (MW $\pm$ SD, n = 11).

Insgesamt wurden 5 jeweils frische Testansätze verarbeitet.

cAMP-Konzentration im Standard (pmol/Probe)	0	2	4	10	20
I_0 / I_x					
MW aus 11 Messungen	1	2,01	3,26	6,45	12,27
$\pm$ Standardabweichung (SD)		0,07	0,18	0,51	1,23
SD in % von I_0 / I_x		3,50	5,50	7,90	10,00

Tab. 2: Meßpunkte zur Erstellung der Eichgeraden

I_0 = Zählrate des Nullstandards

I_x = Zählrate des jeweiligen Standards

MW = Mittelwert

IV.2. Korrelation von Kaliumkonzentration im Zellextrakt und Trockengewicht

Um ein Maß zu erhalten für die Menge an Zellen bzw. deren Volumen, das beim Abkratzen der tiefgefrorenen Froschhaut erfaßt wurde, erfolgte die Bestimmung der Kaliumkonzentration im Zellextrakt.

In Abb. 10 ist der Kaliumgehalt im zellfreien Überstand und das Trockengewicht der Zelltrümmer zueinander in Beziehung gesetzt.

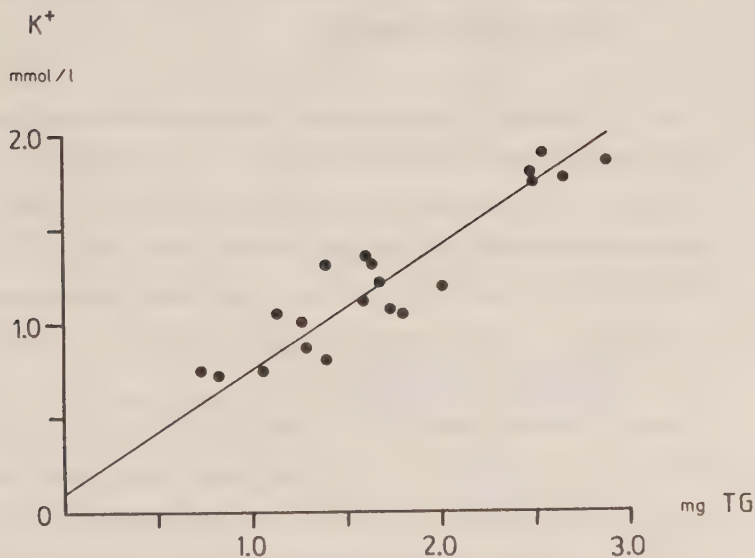


Abb. 10: Korrelation zwischen Kaliumkonzentration im Zellextrakt und Trockengewicht (TG) des zugehörigen Zelniederschlags.

Es zeigt sich hierbei in 20 Messungen eine eindeutig signifikante Korrelation. Der Korrelationskoeffizient beträgt 0,86. Die Steigung der Geraden beträgt $0,68 \text{ mM K}^+ / \text{mg Trockengewicht}$.

Als Bezugsgrößen zur Quantifizierung des cAMP-Gehalts der Froschhaut dienten bisher das Trockengewicht (Johnsen und Nielsen, 1978), das Feuchtgewicht (Hall, 1976) und der Proteingehalt im Zellabfall (Johnsen und Nielsen, 1982; Schorderet et al., 1978).

IV.3. Wirkungen von Arginin-Vasopressin (AVP) und Isobutylmethylxanthin (IBMX) auf den Kurzschlußstrom und die intrazelluläre cAMP-Konzentration

Abb. 11 zeigt die typische Reaktion des Kurzschlußstromes auf die einmalige Gabe von 150 mU/ml AVP auf die Innenseite der Froschhaut. Der Kurzschlußstrom steigt nach Applikation dieser supramaximalen AVP-Dosis nach etwa 5 Minuten kontinuierlich an, um dann nach durchschnittlich 30 Minuten einen neuen steady-state zu erreichen. In 15 Versuchen ergab sich im Mittel ein Anstieg des Kurzschlußstromes um etwa $230 \pm 54 \%$.

Diese 5 Minuten beinhalten eine bestimmte Verzögerung bis zum Wirkungseintritt von AVP. Dies ist zum einen bedingt durch den Transport des Ringers mit AVP über die Rollerpumpen in die eigentliche Inkubationskammer, was einen Zeitraum von etwa 30 Sekunden in Anspruch nimmt. Desweiteren muß man noch berücksichtigen, daß die Lösungen das Bindegewebe durchdringen müssen

um an die Epithelzelle als Erfolgsorgan zu gelangen.

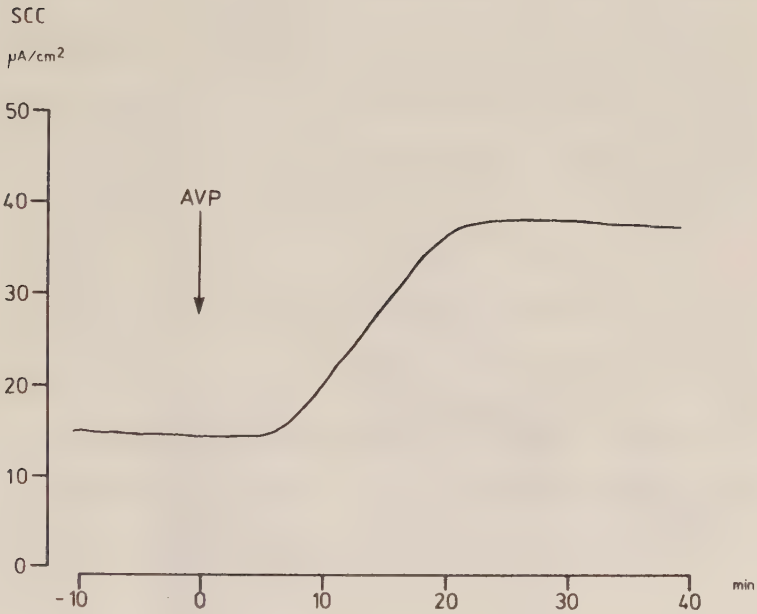


Abb. 11: Kurzschlußstromkurve nach Zugabe von AVP (150 mU/ml) zum Innenbad. Weitere Erläuterungen im Text.

In Abb. 12 ist die Entwicklung der intrazellulären cAMP-Konzentration in den Epithelzellen der Froschhaut nach fünfminütiger Inkubation mit AVP (150 mU/ml) dargestellt.

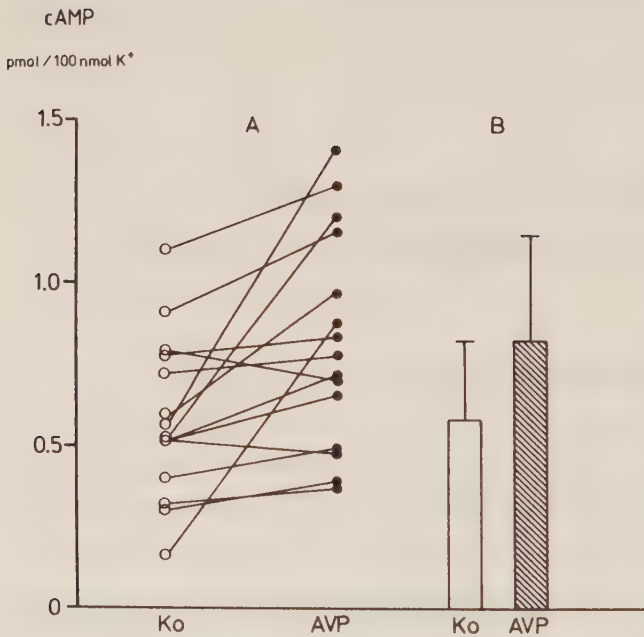


Abb. 12: cAMP-Konzentration im Epithelzellextrakt der Froschhaut unter Kontrollbedingungen (Ko) und nach Inkubation mit AVP (150 mU/ml für 5 Minuten). Teil A = Einzelexperimente, Teil B = $\overline{MW} \pm SD$; (n = 15), (p < 0,01).

In Teil A der Graphik sind die 15 Versuche jeweils einzeln wiedergegeben. In 13 von 15 Fällen zeigt sich ein mehr oder weniger stark ausgeprägter Anstieg der intrazellulären cAMP-Konzentration. Nur in zwei Versuchen kommt es nach AVP-Inkubation zu einem geringen Abfall. Teil B der Abbildung verdeutlicht das Ergebnis nach Zusammenfassung dieser 15 Experimente. So beträgt die cAMP-Konzentration in den Kontrollepithelien $0,58 \pm 0,24$ pmol cAMP/100 nmol K^+ , die der AVP-inkubierten Epithelien $0,82 \pm 0,32$ pmol cAMP/100 nmol K^+ . Es ergibt sich somit ein durchschnittlicher Anstieg um $0,24 \pm 0,20$ pmol cAMP/100 nmol K^+ .

Diese hier beschriebenen Resultate beinhalten Daten mit verschiedenen Verfahren der Zellextraktion, wie sie im Kapitel "Methodik" unter III.3 beschrieben wurden. Da diese Verfahren grundsätzlich die gleichen Resultate erbrachten, wurden sie hier zusammengefaßt. Der durch alleinige Zugabe von siedendem Wasser erfolgte Zellaufschluß macht dabei den weitaus größten Teil ($n = 8$) der Ergebnisse aus.

Da die Zunahme der intrazellulären cAMP-Konzentration unter AVP in der Mehrzahl der Fälle nicht sehr ausgeprägt war, wurde die Wirkung des Phosphodiesterase-Inhibitors IBMX auf die intrazellulären cAMP-Konzentrationen untersucht. Das Ergebnis ist in Abb. 13 dargestellt.

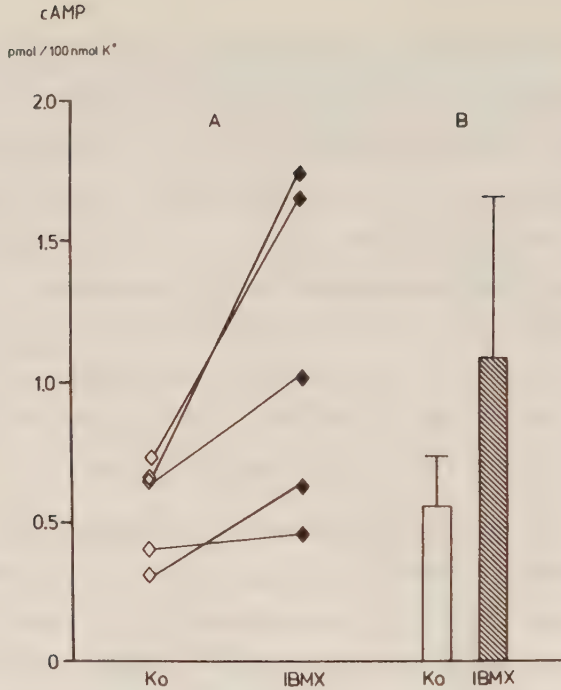


Abb. 13: cAMP-Konzentration im Epithelzellextrakt der Froschhaut unter Kontrollbedingungen (Ko) und nach Inkubation mit IBMX (10^{-5} M für 5 Minuten); Teil A = Einzelexperimente, Teil B = MW $\pm$ SD; (n = 5), (p < 0,05).

Nach Inkubation der Versuchshäute mit 10^{-5} M IBMX für fünf Minuten ergibt sich in vier von fünf Messungen ein deutlicher Anstieg der cAMP-Konzentration im Zellextrakt (A). Der cAMP-Gehalt des Extrakts steigt von $0,55 \pm 0,18$ pmol cAMP/100 nmol K⁺ auf $1,08 \pm 0,57$ pmol cAMP/100 nmol K⁺ (B). Die Differenz beträgt durchschnittlich $0,53 \pm 0,39$ pmol cAMP/100 nmol K⁺ (n = 5).

Da AVP über eine vermehrte Produktion, IBMX dagegen über eine Hemmung des Abbaus zu einer Erhöhung der intrazellulären cAMP-Konzentration führt, wurde in der nächsten Versuchsserie die Entwicklung intrazellulärer cAMP-Konzentrationen bei gleichzeitiger Inkubation mit diesen beiden Substanzen untersucht. Abb. 14 zeigt das Ergebnis dieser Experimente.

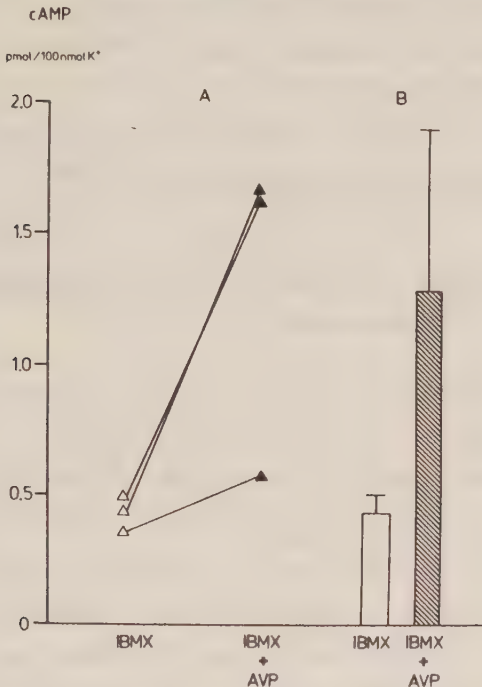


Abb. 14: cAMP-Konzentration im Epithelzellextrakt der Froschhaut nach Inkubation mit IBMX (10^{-5} M, 5 Minuten) (IBMX) und nach Inkubation mit AVP (150 mU/ml) und IBMX (10^{-5} M) für 5 Minuten; Teil A = Einzelexperimente, Teil B = MW $\pm$ SD; (n = 3).

Die Kontrollepithelien wurden 5 Minuten mit IBMX (10^{-5} M) inkubiert, die Testepithelien 5 Minuten mit AVP (150 mU/ml) und IBMX. Unter diesen Bedingungen ist nach Gabe von AVP eine drastische Erhöhung der intrazellulären cAMP-Spiegel von $0,43 \pm 0,07$ pmol cAMP/100 nmol K^+ auf $1,28 \pm 0,62$ pmol cAMP/100 nmol K^+ abzulesen ($n = 3$). Dieser Anstieg um $0,85 \pm 0,55$ pmol cAMP/100 nmol K^+ ist somit sehr viel stärker ausgeprägt als der in Abwesenheit von IBMX beobachtete (siehe Abb. 12).

IV.4. Komponenten innerhalb des cAMP-Assays

IV.4.1. Wirkung von Phosphodiesterase (PDE) und Aktivkohle auf die cAMP-Bestimmungen

Der Anstieg der intrazellulären cAMP-Konzentration in den gerade beschriebenen Versuchen entspricht bei weitem nicht den in der Literatur (Johnsen und Nielsen, 1978; Schorderet et al., 1978) beschriebenen Zunahmen. Somit stellte sich die Frage, ob die ermittelten cAMP-Spiegel den wirklichen zellulären Werten entsprachen, bzw. ob eventuell unbekannte Substanzen im Zellextrakt mit dem Testansatz zur cAMP-Bestimmung interferieren könnten. Um diese Frage zu klären, wurde in der folgenden Serie von Experimenten versucht, cAMP durch PDE oder Aktivkohle aus dem Zellextrakt zu entfernen.

In einer ersten Versuchsreihe wurde der Extrakt mit PDE behandelt. Abb. 15 zeigt das Ergebnis nach Zugabe von 125 mU PDE zu 400 μ l Zellextrakt (≈ 278 mU/ml) bei optimalen Inkubationsbedingungen (37°C , 30 Minuten). In allen 5 Experimenten kommt es zu einer signifikanten Reduktion des cAMP-Gehaltes von durchschnittlich $0,71 \pm 0,18$ pmol cAMP/100 nmol K^{+} auf $0,45 \pm 0,11$ pmol cAMP/100 nmol K^{+} , ($n = 5$). Dies entspricht - wie auch aus Tab. 3 ersichtlich ist - einem PDE-empfindlichen Anteil von durchschnittlich 36 % des gemessenen Kontrollwerts. In keinem Fall wird jedoch der theoretisch zu erwartende Wert 0 erreicht.

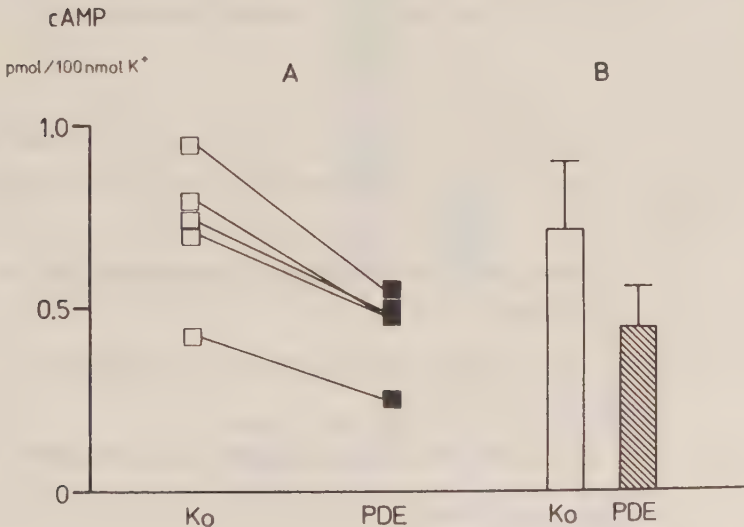


Abb. 15: cAMP-Konzentration im Epithelzellextrakt der Froschhaut unter Kontrollbedingungen (Ko) und nach Inkubation mit PDE (278 mU/ml, 37°C , 30 Minuten); Teil A = Einzelexperimente, Teil B = MW $\pm$ SD; ($n = 5$), ($p < 0,005$).

Kontrolle	nach PDE- Behandlung (278 mU/ml, 37°C, 30 min.)	PDE-empf. Anteil quantitativ	PDE-empf. Anteil in % der Kontrolle
0,94	0,55	0,39	41
0,79	0,48	0,31	39
0,73	0,49	0,24	33
0,70	0,48	0,22	31
0,42	0,25	0,17	40

Tab. 3: cAMP-Konzentration (in pmol/100 nmol K⁺) im Epithelzellextrakt der Froschhaut unter Kontrollbedingungen und nach Inkubation mit Phosphodiesterase (PDE)

Zur weiteren Abklärung dieses Ergebnisses wurde folgendes Wiederfindungsexperiment unternommen. Der aus einem Epithelstück gewonnene Zellextrakt wurde wie folgt aufgeteilt:

1. In 100 µl des Extrakts erfolgte die cAMP-Messung ohne vorherige Behandlung.
2. Zu 100 µl Extrakt wurden 5 pmol cAMP zugegeben und anschließend cAMP bestimmt.
3. Zu 100 µl Extrakt erfolgte die Zugabe von 5 pmol cAMP und von 125 mU PDE (=725 mU/ml). Die PDE-Inkubation erfolgte bei 37°C für 30 Minuten.

In dieser Versuchsreihe entfiel ausnahmsweise die Quantifizierung des cAMP-Gehalts der Proben über die Kalium-Konzentration im Zellextrakt, da die verschiedenen Versuche an dem gleichen

Extrakt durchgeführt wurden, d.h. die eingesetzte Menge an Zellen unter den Bedingungen 1 - 3 jeweils identisch war.

Das Ergebnis dieser Versuche ist in Abb. 16 dargestellt.

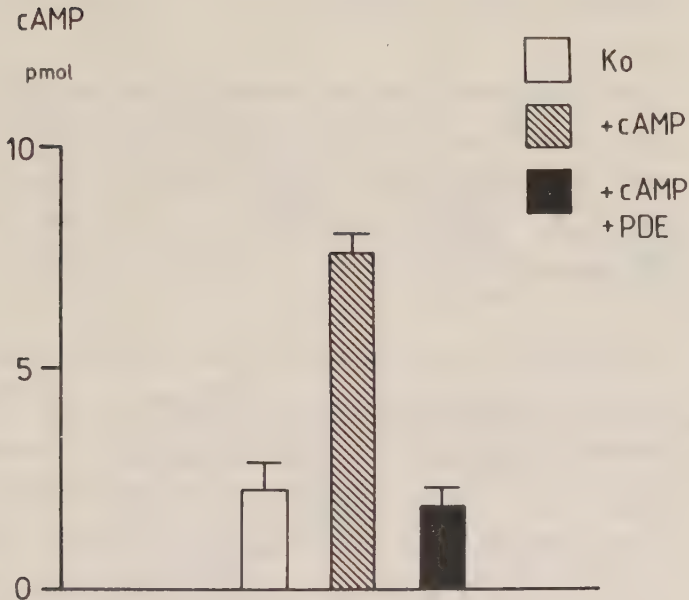


Abb. 16: cAMP-Bestimmungen zur Testung des Assays und der Wirksamkeit der PDE. Ein Teil des Zellextraktes diente als Kontrolle (Ko), zu einem zweiten Teil erfolgte die Zugabe von 5 pmol cAMP (+cAMP) und zu einem dritten die Zugabe von 5 pmol cAMP und PDE (725 mU/ml, 37°C, 30 Minuten) (+cAMP +PDE); (n = 4).

Der cAMP-Gehalt des unbehandelten Teils des Extraktes (= Kontrolle) beträgt $2,28 \pm 0,61$ pmol cAMP. Nach Zugabe von 5 pmol cAMP ergibt sich eine neue cAMP-Konzentration von $7,58 \pm 0,42$ pmol cAMP, und nach zusätzlicher Inkubation mit PDE sinkt der cAMP-Gehalt wieder auf Werte von $1,9 \pm 0,43$ pmol cAMP ab; ($n = 4$).

Aus diesem Ergebnis läßt sich ableiten, daß die zugesetzte PDE sehr wohl in der Lage ist, cAMP zu hydrolysieren. Desweiteren ist damit auch gezeigt, daß das verwendete cAMP-Assay in der Lage ist, extern zugefügtes cAMP mit einem relativ geringen Fehler nachzuweisen.

Da auch Aktivkohle in der Lage ist cAMP zu binden (Brown et al., 1971; Angaben der Fa. Boehringer/Mannheim), wurde in einer nächsten Versuchsserie dem Zellextrakt Aktivkohle zugegeben. Abb. 17 (A und B) stellt das Ergebnis jener Versuche dar, bei denen der Extrakt für 20 Minuten mit Aktivkohle behandelt wurde. Es zeigt sich eine Reduktion der Kontrollwerte von durchschnittlich $0,76$ pmol cAMP/100 nmol K^+ auf Werte von $0,27$ pmol cAMP/100 nmol K^+ , was einer Elimination von cAMP zu ca. 65 % entspricht ($n = 2$).

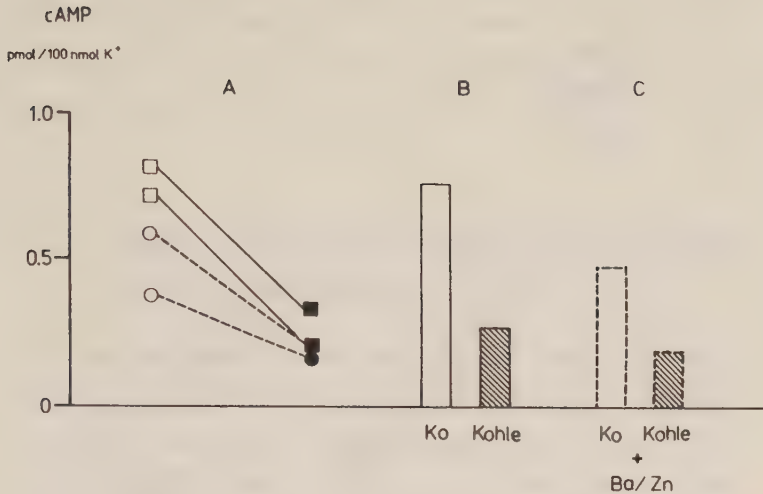


Abb. 17: Teil A : cAMP-Konzentration im Epithelzellextrakt der Froschhaut unter Kontrollbedingungen (□), nach Inkubation mit Aktivkohle (■), nach Ba(OH)₂ und ZnSO₄-Inkubation (○) und nach Kohleinkubation mit Ba(OH)₂ und ZnSO₄ (●), (jeweils n = 2). Teil B und C: MW.

Zur Untersuchung eines möglichen synergistischen Effekts bei der Substanzen bei der Elimination von cAMP erfolgte die kombinierte Behandlung einiger Zellextrakte mit PDE (278 mU/ml, 30 Minuten, 37°C) und Aktivkohle. Nach Entfernung der PDE aus dem Zellextrakt durch Denaturierung und anschließende Abzentrifugation wurde die Aktivkohle für 20 Minuten zugegeben. Das Ergebnis

dieser Experimente ist in Abb. 18 dargestellt.

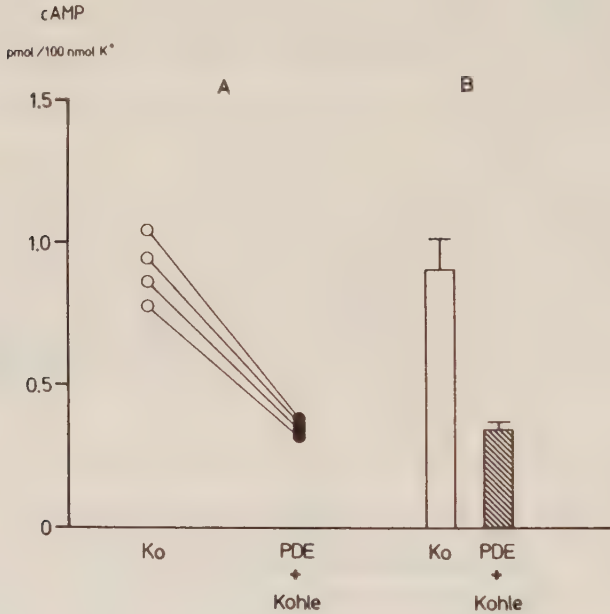


Abb. 18: cAMP-Konzentration im Epithelzellextrakt der Froschhaut unter Kontrollbedingungen (Ko) und nach Inkubation mit PDE (278 mU/ml, 37°C, 30 Minuten) und Aktivkohle (PDE+Kohle); Teil A = Einzelmessungen, Teil B = $\bar{M} \pm SD$; (n = 4), (p < 0,001).

Der Extrakt der Kontrollepithelien zeigt einen durchschnittlichen cAMP-Gehalt von $0,9 \pm 0,18$ pmol cAMP/100 nmol K⁺, der der mit PDE und Kohle behandelten Extrakte eine cAMP-Konzentration von $0,34 \pm 0,03$ pmol cAMP/100 nmol K⁺. Durch die kombinierte

Behandlung wurden somit 0,56 pmol cAMP/100 nmol K^+ (= 62 %) aus dem Zellextrakt entfernt ($n = 4$). Dies bedeutet, daß Aktivkohle und PDE zusammen nicht mehr cAMP zu eliminieren vermögen als Aktivkohle allein.

IV.4.2. Einfluß verschiedener Reinigungsverfahren auf die intra-epitheliale cAMP-Bestimmung

Um cAMP von anderen Nukleotiden zu trennen, wurden von anderen Autoren verschiedene Reinigungsverfahren angewendet (Krishna et al., 1968; Ramachandran, 1972; Johnsen und Nielsen, 1978; Schorderet et al., 1978). Die beiden bei der Bestimmung des cAMP-Gehalts im Froschhautepithel bereits angewandten Methoden wurden in den folgenden Versuchen getestet.

In einer ersten Versuchsreihe wurde die Wirksamkeit der Reinigung mit Hilfe von Bariumhydroxid und Zinksulfat (Krishna et al., 1968) getestet. Die Hälfte des Extraktes wurde mit PDE (278 mU/ml, 30 Minuten, 37°C) inkubiert und danach zweimal mit $\text{Ba}(\text{OH})_2$ und ZnSO_4 gereinigt. Das Ergebnis ist in Abb. 19 dargestellt. Die cAMP-Konzentration der gereinigten und zusätzlich PDE-behandelten Zellextrakte ist mit $0,27 \pm 0,03$ pmol cAMP/100 nmol K^+ um 0,60 pmol cAMP/100 nmol K^+ niedriger als die der unbehandelten Kontrolle mit $0,87 \pm 0,29$ pmol cAMP/100 nmol K^+ ($n = 4$). Der durch PDE-Anwendung und zusätzliche Reinigung entfernte Anteil ist mit 69 % etwa doppelt so hoch wie der ohne zusätzliche Reinigung erhaltene Wert von 36 % (siehe Abb. 15 und Tab. 3).

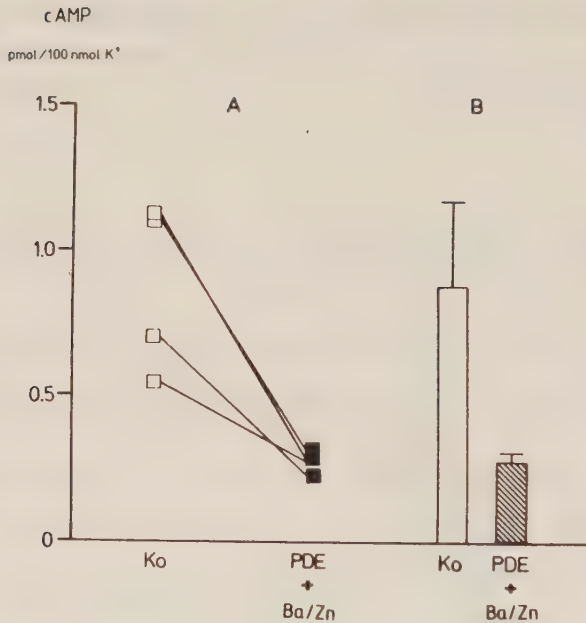


Abb. 19: cAMP-Konzentration im Epithelzellextrakt der Froschhaut unter Kontrollbedingungen (Ko) und nach Inkubation mit PDE (278 mU/ml, 37°C, 30 Minuten) und Reinigung mit Ba(OH)₂+ZnSO₄ (PDE+Ba/Zn); Teil A = Einzelexperimente, Teil B = MW ± SD; (n = 4), (p < 0,005).

Ein anderes Reinigungsverfahren bestand in der Verwendung von Aluminiumoxid (Al₂O₃) (Ramachandran, 1972). Ein Teil des Epithelzellextrakts wurde vor der Reinigung mit Al₂O₃ zusätzlich mit PDE

(278 mU/ml, 30 Minuten, 37°C) inkubiert. Dabei ergaben sich die aus Abb. 20 ersichtlichen Resultate.

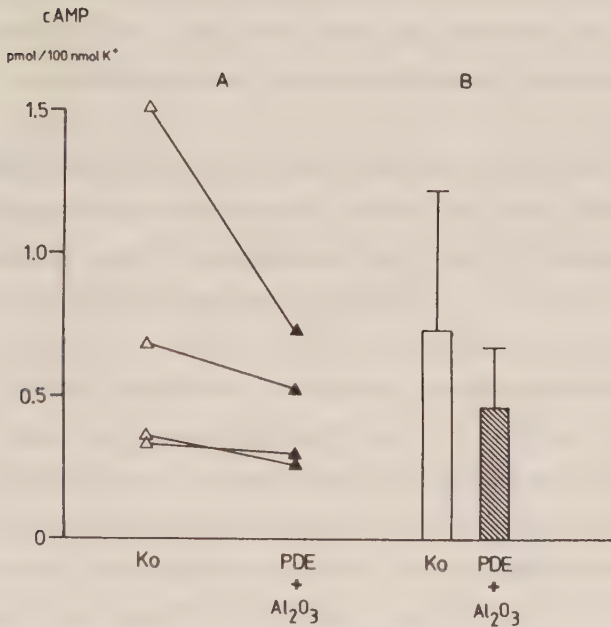


Abb. 20: cAMP-Konzentration im Epithelzellextrakt der Froschhaut unter Kontrollbedingungen (Ko) und nach Inkubation mit PDE (278 mU/ml, 37°C, 30 Minuten) und Reinigung mit Al₂O₃ (PDE+Al₂O₃); Teil A = Einzelexperimente, Teil B = MW ± SD; (n = 4), (p < 0,20).

Die cAMP-Konzentration der mit PDE und Al_2O_3 behandelten Extrakte ist um durchschnittlich $0,28 \text{ pmol cAMP}/100 \text{ nmol K}^+$ niedriger als die der Kontrollextrakte, deren cAMP-Wert $0,73 \pm 0,5 \text{ pmol cAMP}/100 \text{ nmol K}^+$ beträgt ($n = 4$). Dieses Ergebnis entspricht fast exakt dem Resultat bei der Behandlung der Extrakte mit PDE ohne zusätzlichen Reinigungsschritt (siehe Abb. 15). Al_2O_3 hatte somit in unseren Experimenten keinerlei reinigenden Effekt.

Desweiteren wurde die kombinierte Wirkung von Aktivkohle und $\text{Ba}(\text{OH})_2\text{-ZnSO}_4$ -Reinigung auf den cAMP-Gehalt im Zellextrakt untersucht. Abb. 17 (A und C) veranschaulicht die hierbei erhobenen Resultate. Der cAMP-Gehalt des Kontrollepithelextrakts beträgt $0,76 \text{ pmol cAMP}/100 \text{ nmol K}^+$, der der nur mit $\text{Ba}(\text{OH})_2$ und ZnSO_4 gereinigten Extrakte durchschnittlich $0,48 \text{ pmol cAMP}/100 \text{ nmol K}^+$. Die zusätzlich vorher mit Aktivkohle inkubierten Extrakte weisen einen cAMP-Gehalt von durchschnittlich $0,19 \text{ pmol cAMP}/100 \text{ nmol K}^+$ auf ($n = 2$). Dies entspricht einer Differenz von $0,29 \text{ pmol cAMP}/100 \text{ nmol K}^+$. Die kombinierte Behandlung der Extraktes mit Aktivkohle und Ba/Zn-Präzipitation bringt somit eine Elimination von cAMP zu 75 % im Vergleich zur völlig unbehandelten Kontrolle. Da allerdings Aktivkohle alleine bereits 65 % cAMP im Extrakt zu binden vermag (siehe Abb. 17, S.63) scheint die zusätzliche Inkubation mit $\text{Ba}(\text{OH})_2 + \text{ZnSO}_4$ keine signifikante Verbesserung zu erbringen.

IV.5. Wirkungen von Ca-Ionophor A 23187 auf die intraepitheliale cAMP-Konzentration

Anhand der soeben beschriebenen Versuchsergebnisse wird deutlich, daß ein großer Teil der im cAMP-Assay ermittelten Substanzen nicht cAMP entsprechen dürfte. Deshalb wurde bei der experimentellen Untersuchung der Wirkungen des Ca-Ionophors A 23187 auf die intrazellulären cAMP-Konzentrationen des Froschhautepithels nur noch der PDE-empfindliche Anteil der gemessenen cAMP-Konzentrationen berücksichtigt. Die Bestimmung dieses Anteils erfolgte nach dem im Kapitel "Methodik" unter Punkt III.8 erläuterten Verfahren.

Abb. 21 zeigt die in einer ersten Versuchsreihe gewonnenen Ergebnisse: Nach alleiniger Gabe von AVP (150 mU/ml) für 5 Minuten erhöht sich das intrazelluläre cAMP von $0,19 \pm 0,02$ auf $0,29 \pm 0,12$ pmol cAMP/100 nmol K^+ . Bei den Epithelien, die zuvor 60 Minuten lang mit 3 μ M Ionophor und anschließend für 5 Minuten mit 150 mU/ml AVP inkubiert wurden, ergibt sich ein deutlich höherer cAMP-Wert von $0,8 \pm 0,17$ pmol cAMP/100 nmol K^+ . Durch zusätzliche Gabe von IBMX (10^{-5} M für 5 Minuten) kann keine weitere signifikante Änderung der cAMP-Werte erzielt werden. Die mittlere cAMP-Konzentration beträgt in diesem Fall $0,68 \pm 0,08$ pmol cAMP/100 nmol K^+ ($n = 4$).

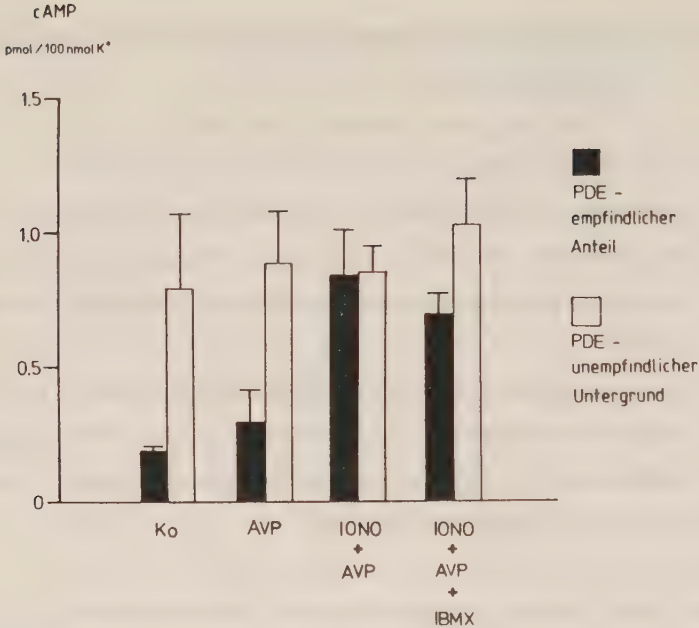


Abb. 21: cAMP-Konzentration im Epithelzellextrakt der Froschhaut unter Kontrollbedingungen (Ko), nach Inkubation mit AVP (150 mU/ml, 5 Minuten) (AVP), nach Inkubation mit Ionophor A 23187 (3 μ M, 60 Minuten) und AVP (IONO+AVP) und bei gleichzeitiger Anwesenheit von Ionophor, AVP und IBMX (10^{-5} M, 5 Minuten) (IONO+AVP+IBMX); (n = 4).

Schwarz dargestellt ist der PDE-empfindliche Anteil innerhalb des Extraktes. Dieser ergibt sich aus cAMP-Konzentration im unbehandelten Extrakt minus cAMP-Konzentration im Extrakt nach Inkubation mit PDE (625 mU/ml, 37°C, 30 Minuten) (= weiße Säule).

Signifikanz (p)	AVP	AVP+IONO	AVP+IONO+IBMX
Ko	> 0,05	< 0,001	< 0,001
AVP		< 0,005	< 0,005
AVP+IONO			> 0,05

Aufgrund dieser Ergebnisse lag die Vermutung nahe, daß der Ionophor entweder die intrazelluläre PDE selbst oder aber das im Experiment zugegebene IBMX in seiner Funktion beeinträchtigt. Zur Beantwortung dieser Frage wurde deshalb noch eine weitere Versuchsserie unternommen, wobei ein Hautstück nur mit Ionophor ($3 \mu\text{M}$ für 60 Minuten), ein zweites mit Ionophor und IBMX (10^{-5} M , 5 Minuten) inkubiert wurde. Das Resultat dieser Versuche ist in Abb. 22 wiedergegeben.

Der cAMP-Wert der Kontrolle beträgt - wie in den vorherigen Versuchen - $0,20 \pm 0,11 \text{ pmol cAMP}/100 \text{ nmol K}^+$. Nach Inkubation mit dem Ionophor erhöht sich die intraepitheliale cAMP-Konzentration auf $0,56 \pm 0,26 \text{ pmol cAMP}/100 \text{ nmol K}^+$, eine weitere Steigerung auf $0,96 \pm 0,23 \text{ pmol cAMP}/100 \text{ nmol K}^+$ ist durch zusätzliche Gabe von IBMX zu erreichen ($n = 5$).

Dieses Ergebnis zeigt, daß IBMX auch in Anwesenheit des Ionophors noch eine steigernde Wirkung auf den cAMP-Gehalt der Zelle entfalten kann und daß der Ionophor nicht nur in Kombination mit AVP, sondern bereits alleine die zelluläre cAMP-Konzentration zu steigern vermag.

Desweiteren sind in den Abbildungen (21 und 22) diejenigen Anteile aufgetragen, die trotz Inkubation der Zellextrakte mit PDE (625 mU/ml , 37°C , 30 Minuten) mit dem cAMP-Assay erfaßt wurden. In der ersten Versuchsreihe (Abb. 21) ergibt sich für diesen Anteil ein Wert von $0,88 \pm 0,10 \text{ pmol}/100 \text{ nmol K}^+$. In der zweiten Serie (Abb. 22) ist dieser Wert bei Verwendung eines frischen cAMP-Bindungsassays etwas niedriger und beträgt $0,60 \pm 0,16 \text{ pmol cAMP}/100 \text{ nmol K}^+$.

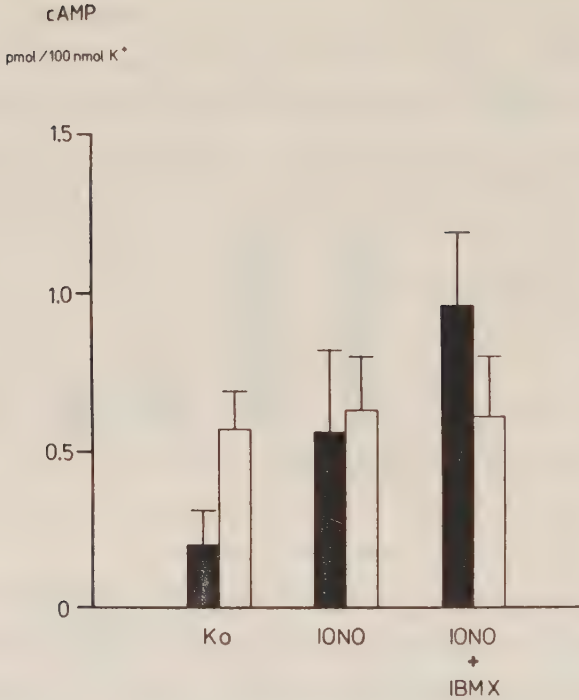


Abb. 22: cAMP-Konzentration im Epithelzellextrakt der Froschhaut unter Kontrollbedingungen (Ko), nach Inkubation mit Ionophor A 23187 (3 μ M, 60 Minuten) (IONO) und nach Inkubation mit Ionophor und IBMX (10^{-5} M, 5 Minuten) (IONO+IBMX); (n = 5). Weitere Erläuterungen siehe Abb. 21.

Signifikanz (p)	IONO	IONO+IBMX
Ko	< 0,025	< 0,001
IONO		< 0,005

IV.6. Zusammenhang zwischen cAMP-Konzentration und Kurzschlußstrom

Abb. 23 zeigt die Ergebnisse von 9 Versuchen, bei denen unter AVP (150 mU/ml, 5 Minuten) gleichzeitig die Änderungen im intrazellulären cAMP-Gehalt und im Kurzschlußstrom gemessen wurden.

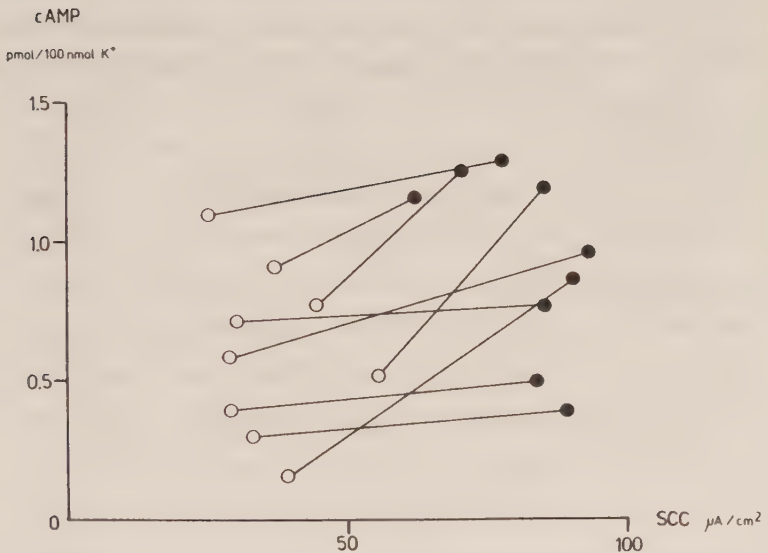


Abb. 23: cAMP-Konzentration im Epithelzellextrakt der Froschhaut und Kurzschlußstrom (SCC) an der intakten Froschhaut unter Kontrollbedingungen (○) und nach Inkubation mit AVP (150 mU/ml, 5 Minuten) (●); (n = 9). Weitere Erläuterungen im Text.

Die Werte für den Kurzschlußstrom wurden nach Erreichen eines steady state (im Durchschnitt 30 Minuten nach Zugabe von AVP) abgelesen.

In jedem Fall ist der Anstieg im Kurzschlußstrom mit einer Erhöhung des intrazellulären cAMP verbunden, wobei die Steilheit der Beziehung jedoch sehr unterschiedlich ist. Da weder bei den AVP-behandelten noch bei den Kontrollepithelien der unspezifische Anteil im cAMP-Assay bestimmt wurde, muß die Frage offen bleiben, ob die unterschiedliche Steilheit einer biologischen Variation oder unterschiedlich hohen unspezifischen cAMP-Anteilen entspricht.

V. Diskussion

Die Zugabe von Antidiuretischem Hormon (ADH) auf die Innen- (= Blutseite) führt sowohl an der Krötenharnblase als auch an der Froschhaut zu einem Anstieg des aktiven transzellulären Natriumtransports und der Wasserpermeabilität. Als intrazelluläres Korrelat zu diesen Effekten findet man eine Zunahme des intrazellulären cAMP-Gehalts (Handler et al., 1965; Sapirstein und Scott, 1973; Hall et al., 1976; Johnsen und Nielsen, 1978, 1980, 1982; Schorderet et al., 1978). Dies legt den Schluß nahe, daß cAMP den intrazellulären Mediator für die hormonell hervorgerufenen Änderungen der epithelialen Transportleistungen darstellt. Tatsächlich können die Wirkungen von ADH durch Gabe von cAMP imitiert werden (Orloff et al., 1962; Petersen und Edelman, 1964; Argy et al., 1967). Zusätzlich ergaben sich in jüngerer Vergangenheit eindeutige Hinweise dafür, daß neben dem cAMP auch das intrazelluläre Kalzium bei der Regulation epithelialer Transporte eine wichtige Rolle spielt (Wiesmann et al., 1977; Nielsen, 1978; Balaban und Mandel, 1979; Taylor und Windhager, 1979; Johnsen und Nielsen, 1982).

Die vorliegende Arbeit hatte zum Ziel, die intrazellulären cAMP-Konzentrationen im Epithel der Froschhaut unter verschiedenen experimentellen Bedingungen, die den cAMP- und Kalzium-Stoffwechsel der Zellen beeinflussen, zu bestimmen. Dazu wurde zunächst eine neue Methode zur Gewinnung isolierter Epithelzellen entwickelt, deren Vorteile gegenüber bisher angewendeten Techniken im Folgenden diskutiert werden.

V.1. Bisherige Präparationstechniken zur Gewinnung von isolierten Epithelzellen der Froschhaut

Wie in Kapitel II bereits dargestellt, sind die an der Krötenharnblase und an der Froschhaut beobachteten Transportvorgänge allein eine Leistung der Epithelzellen. Im Gegensatz zu der Vielzahl an cAMP-Bestimmungen an der Harnblase (Handler et al., 1965; Hynie und Sharp, 1971; Sapirstein und Scott, 1973; Omachi et al., 1974; Wiesmann et al., 1977; Levine et al., 1981; Schlondorff et al., 1981; Mia et al., 1983) sind bisher nur wenige direkte Messungen des intrazellulären cAMP an der Froschhaut durchgeführt worden (Hall et al., 1976; Johnsen und Nielsen, 1978, 1982; Schorderet et al., 1978). Eine Ursache hierfür muß wohl darin gesehen werden, daß erst mit Beginn der siebziger Jahre praktikable Techniken zur Trennung des Epithels der Froschhaut vom darunterliegenden Bindegewebe entwickelt wurden (Erlj und Aceves, 1969; Aceves und Erlj, 1971; Rajerison et al., 1972; Thompson und Mills, 1981; siehe auch Kapitel II).

Die beschriebenen Verfahren zur Gewinnung isolierten Froschhautepithels sind jedoch mit möglichen Fehlern behaftet, die die Messungen des cAMP beeinflussen können. Bei dem von Aceves und Erlj (1971) angewandten Verfahren zur Epithelisation (Kollagenaseinkubation + Hydrostatischer Druck) besteht das isolierte Epithel noch zu 20 % aus Drüsenzellen. Untersuchungen mit der Elektronenstrahlmikrosonde (Rick et al., 1978, 1984; Dörge et al., 1981) deuten aber darauf hin, daß Drüsenzellen

keinerlei Anteil am transepithelialen Natriumtransport haben. Andererseits muß angenommen werden, daß Drüsen in der Froschhaut über adrenerge Rezeptoren mit einem Adenylcyclasesystem verfügen, das den cAMP-Stoffwechsel beeinflusst. Den Nachweis solcher Rezeptoren führten unter anderem Thompson und Mills (1981), die unter dem Einfluß von Isoproterenol einen Anstieg des Kurzschlußstromes nachwiesen, der auf eine Transportsteigerung in den Drüsenzellen der Froschhaut zurückgeführt werden konnte. Den direkten Beweis eines Adenylcyclasesystems in Drüsenzellen erbrachten Prince und Mitarbeiter (1973) an der Speicheldrüse der Fliege. In diesen Untersuchungen wurde zum einen eine erhöhte Speichelsekretion nach cAMP-Zugabe und zum anderen ein Anstieg der intrazellulären cAMP-Konzentration unter 5-Hydroxytryptamin nachgewiesen. Diese Resultate bestätigen, daß auch in Drüsen cAMP als "second messenger" fungiert.

Direkte Wirkungen von ADH auf die Transportleistung der Froschhautdrüsen sind bisher noch nicht nachgewiesen worden. Es erscheint zudem unwahrscheinlich, daß ein Hormon mit spezifischer Wirkung auf die Wasser- und Natriumresorption sekretorische Prozesse in den Drüsenzellen beeinflussen könnte.

Andererseits entfalten auch Hormone, die nicht direkt mit dem Wasser- und Salzhaushalt in Verbindung gebracht werden können, wie z.B. Oxytocin, Wirkungen auf den Natrium- und Wassertransport an der Krötenharnblase (Bockaert et al., 1972) und der Froschhaut (Schorderet et al., 1978). Bei Catecholaminen oder Sympathomimetika (Isoproterenol) muß davon ausgegangen werden, daß sie auch an den Drüsenzellen ihre Wirkung entfalten und die Adenylcyclase

stimulieren. Das gleiche gilt für die Gruppe der Inhibitoren (Theophyllin, IBMX, Papaverin), die das cAMP-abbauende Enzym Phosphodiesterase (PDE) in seiner Aktivität hemmen, da man für jede Zelle mit Adenylcyclaseaktivität und damit verbundener cAMP-Produktion auch ein abbauendes Enzymsystem, die PDE, erwarten sollte.

Rajerison und Mitarbeiter (1972) verwendeten das prinzipiell gleiche Inkubationsverfahren wie Aceves und Erlij (1971) zur Präparation der Haut von *Rana esculenta* (siehe Tab. 4). Obwohl die Autoren nicht auf die Frage eingehen, inwieweit an dem mit ihrer Methode gewonnenem Epithel noch Drüsengewebe anhaftet, sollte man dies bei den angewandten Inkubationsbedingungen jedoch erwarten.

Thompson und Mills (1981) gelang es erst nach Steigerung der Kollagenase-Konzentration auf 100 U/ml und Senkung des Drucks auf 2,5 cm H₂O ein drüsenfreies Epithel zu gewinnen (siehe Tab. 4).

Die soeben dargelegten Überlegungen müssen bei der Beurteilung der bisherigen cAMP-Bestimmungen an der Froschhaut berücksichtigt werden.

Autor	verwendete Kollagenase-Konz.	Hydrostat. Druck	Gesamtdauer der Inkub.	Temp.	Anteil der Drüsen im Präparat
Aceves u. Erlj 1971	100 mg/ml	30 cm H ₂ O 15 min. am Ende der Inkubation	2 h	Zimmertemp.	20 %
Rajerison et al. 1972	43 U/ml	15 cm H ₂ O für die Gesamtdauer der Inkubation	90 min	35°C	?
Thompson u. Mills 1981	100 U/ml	2,5 cm H ₂ O für die Gesamtdauer der Inkubation	60 min	37°C	keine Drüsen
Johnsen u. Nielsen 1978	43 U/ml	----	60 - 90 min	Zimmertemp.	?

Tab. 4: Zusammenstellung bisheriger Verfahren zur Gewinnung von isoliertem Froschhautepithel bei Verwendung von Kollagenase.

V.1.1. Präparationsverfahren bei den bisherigen cAMP-Bestimmungen an der Froschhaut

Hall und Mitarbeiter (1976) untersuchten u.a. die Wirkung von Prostaglandin E_1 , Prostagladinsynthesehemmern (Indomethacin) und von Theophyllin auf intrazelluläre cAMP-Konzentrationen der Froschhaut. Da hierbei die gesamte Froschhaut homogenisiert wurde, werden bei den Ergebnissen die Änderungen im cAMP-Spiegel aller in der Froschhaut vorkommenden Zellen (Na-resorbierende Epithelzellen, Drüsenzellen, Mitochondrienreiche Zellen) und in allen weiteren zellulären Strukturen im Bindegewebe erfaßt. Die Interpretation der Ergebnisse der cAMP-Messungen unter alleiniger Betrachtung transepithelialer Natriumtransportvorgänge ist praktisch nicht möglich, insbesondere da alle drei untersuchten Substanzen keine besondere Organ- oder Zellspezifität aufweisen.

Schorderet und Mitarbeiter (1978) hielten sich exakt an die von Rajerison (Rajerison et al., 1972) vorgeschlagene Inkubation zur Isolierung des Froschhautepithels. Wie bereits dargestellt, muß bei diesem Verfahren davon ausgegangen werden, daß dem Epithel noch Drüsengewebe anhaftet. Da diese Autoren den Effekt relativ unspezifisch wirksamer Substanzen wie Catecholamine, Sympathomimetika (Isoproterenol), PDE-Inhibitoren (Theophyllin, IBMX, Papaverin) und Oxytocin auf die intraepitheliale cAMP-Konzentration untersuchten, kann nicht ausgeschlossen werden, daß ein Teil der beobachteten Änderungen im cAMP-Gehalt durch

Änderungen im cAMP-Spiegel von Drüsenzellen verursacht wurde.

Johnsen und Nielsen (1978; 1982) modifizierten zur Isolierung des Epithels der Froshhaut (*Rana temporaria*) das von Rajerison und Mitarbeitern (1972) vorgeschlagene Verfahren (siehe auch Tab. 4). Zum einen verzichteten sie auf die Anwendung von hydrostatischem Druck und zum anderen erfolgte die gesamte Inkubation für 60 - 90 Minuten bei Zimmertemperatur statt bei 35°C, da nach ihren Angaben die Haut von *Rana temporaria* die erhöhte Temperatur nicht tolerierte. Diese Änderung beinhaltet zwei nicht unerhebliche Einschränkungen im Inkubationserfolg. Zum einen fällt durch den fehlenden Druck eine Unterstützung der durch die Kollagenase hervorgerufenen Trennung zwischen Epithel und Bindegewebe weg und zum anderen ist mit der Senkung der Inkubationstemperatur von 35°C auf etwa 20°C Zimmertemperatur ein erheblicher Aktivitätsverlust der Kollagenase verbunden. Auch bei dieser Inkubationstechnik kann nicht ausgeschlossen werden, daß dem isolierten Epithel noch Drüsengewebe anhängt, so daß die beobachteten Änderungen in der cAMP-Konzentration nach Theophyllin- bzw. nach Ca-Ionophor-Inkubation sowohl durch Beeinflußung der Naresorbierenden Zellen als auch der Drüsenzellen hervorgerufen werden könnten.

Aceves und Erlij (1971) wie auch Rajerison et al. (1972) berichten, daß nach Behandlung der Epithelien mit Kollagenase und Druck die elektrischen Transportparameter (Kurzschlußstrom und Potentialdifferenz) der isolierten Epithelien denen von unbehandelten Epithelien entsprachen und die volle Ansprechbarkeit

des isolierten Epithels auf ADH erhalten blieb. Im Gegensatz dazu räumen Johnsen und Nielsen (1978) in ihrer Arbeit ein, daß durch die vorherige Inkubation der Froschhaut mit Kollagenase offensichtlich einige ADH-Rezeptoren an den Epithelzellen zerstört worden sind.

Um in den vorliegenden Untersuchungen allein cAMP-Konzentrationen der Na-resorbierenden Zellen zu erfassen und eine mögliche Beeinträchtigung der Rezeptoren in den basolateralen Membranen durch Kollagenase zu vermeiden, wurde eine neue Präparationstechnik für die Froschhaut entwickelt, bei der auf die Anwendung von Kollagenase verzichtet wurde. Die verwendeten Substanzen wurden an der intakten Froschhaut getestet. Da zudem die Na-resorbierenden Epithelzellen erst nach dem Einfrieren der Froschhaut durch vorsichtiges Abschaben der oberflächlichen Schichten gewonnen wurden, konnte eine Miterfassung der tiefer gelegenen Drüsenzellen vermieden werden.

V.2. Anwendbarkeit der neuen Methodik zur Gewinnung von isolierten Epithelzellen der Froschhaut

V.2.1. Inkubation der Froschhäute

Die bei den Experimenten verwendeten Substanzen AVP, IBMX und Ionophor A 23187 rufen ihre Wirkung auf den Na-Transport vorwiegend bei Applikation auf die Innenseite des Epithels hervor (Orloff und Handler, 1962; Nielsen, 1978; Balaban und Mandel, 1979). Zur Vereinfachung der Inkubationstechnik wurden die auf die Ringe gespannten Froschhäute daher nicht seitengetrentt inkubiert.

Die Inkubationszeit betrug für IBMX und AVP jeweils 5 Minuten. Dieser Zeitraum wurde deshalb gewählt, weil a) Johnsen und Nielsen (1978) eine maximalen cAMP-Wert im Epithel von *Rana temporaria* 3 - 5 Minuten nach Inkubationsbeginn mit AVP feststellen konnten und weil b) auch Schorderet und Mitarbeiter (1978) für ihre Messungen durchwegs eine Inkubationszeit von 5 Minuten gewählt hatten. Für auftretende Unterschiede in den Ergebnissen sollte somit die Inkubationszeit keine Rolle spielen. Die etwas längere Inkubationszeit von 5 Minuten wurde auch deshalb gewählt, weil bei der vorliegenden Präparation das Bindegewebe noch vorhanden war und somit für die Wirkstoffe eine längere Diffusionsstrecke und -zeit bis zum Erreichen des Rezeptors an der Epithelzelle einkalkuliert werden mußte. Die durch das Bindegewebe bedingte Verzögerung des Wirkungseintritts der getesteten Substanzen sollte etwa 1 Minute betragen.

Bei den Versuchen, bei denen der Ca-Ionophor A 23187 angewendet wurde, erfolgte eine Vorinkubation der Häute mit $3 \mu\text{M}$ Ionophor für 60 Minuten, da Wiesmann und Mitarbeiter (1977) an isolierten Epithelzellen der Krötenharnblase nachgewiesen hatten, daß diese nach 1-stündiger Inkubation mit Ionophor 100 % mehr radioaktiv markiertes Kalzium aufnehmen als Kontrollzellen. Zudem ist aus der Literatur (Wiesmann et al., 1977; Taylor und Windhager, 1979) bekannt, daß sichtbare hemmende Effekte des Ionophors im Kurzschlußstrom erst nach einem längeren Zeitraum (45 - 120 Minuten) beobachtet werden können.

V.2.2. Gewinnung isolierter Epithelzellen

Die Beendigung der Inkubation erfolgte durch rasches Eintauchen des Hautstückes in flüssigen Stickstoff. Das Einfrieren der Haut war Voraussetzung für die weiteren Präparationsschritte und bedeutete gleichzeitig einen sofortigen Stop aller in den Epithelzellen ablaufenden Stoffwechselvorgänge. Anschließend erfolgte die Isolierung der Epithelzellen durch Abkratzen von der tiefgefrorenen Haut mit Hilfe eines Skalpell. Bedingt durch die Tatsache, daß die Grenze zwischen Epidermis und darunterliegenden Bindegewebe keine plane Fläche darstellt, sondern die beiden Hautanteile zapfenartig miteinander verknüpft sind, ergaben sich folgende Probleme:

1. Trotz vorsichtigen Abschabens der Na-resorbierenden Zellen konnte eine geringfügige Miterfassung des darunterliegenden Bindegewebes nicht immer vermieden werden. In Stichproben-

artigen lichtmikroskopischen Untersuchungen zeigte sich jedoch, daß Bindegewebe und im Bindegewebe gelegene Drüsenzellen in seltensten Fällen einen nennenswerten Beitrag zum Zellextrakt lieferten.

2. In aller Regel konnte somit vorwiegend nur Epithelmateriale aus den oberen Schichten (Stratum corneum, granulosum und spinosum) gewonnen werden. Das Stratum germinativum wurde meist nur zu etwa 50 % erfaßt, da ein weitergehendes Abkratzen des Stratum germinativum zur großflächigen Miterfassung von Strukturen des Bindegewebes, unter anderem auch von Drüsengewebe, geführt hätte.

Da AVP nur bei Applikation auf die Innenseite der Haut eine Wirkung zeigt, muß davon ausgegangen werden, daß die entsprechenden Hormonrezeptoren in den basolateralen Zellmembranen und damit auch in den Zellmembranen der Zellen des Stratum germinativum lokalisiert sind. Im Prinzip wäre es sogar denkbar, daß allein in dieser Zellschicht die cAMP-Produktion durch AVP abläuft.

AVP vermittelt den Anstieg des transzellulären Natriumtransports allerdings primär durch einen erhöhten passiven Einstrom von Natriumionen über die apikale Membran der Zellen des Stratum granulosum (siehe Zwei-Barrieren-Modell in Kapitel II). Man muß deshalb davon ausgehen, daß entweder die AVP-induzierten Stoffwechselprozesse in allen Zellagen (mit Ausnahme des Stratum corneum) ablaufen, oder daß cAMP, falls es ausschließlich in den tieferen Zellagen gebildet wird, über Zwischenzellverbindungen in die äußeren Zellagen diffundieren kann um dort wirksam zu werden.

Gegen die letztere Hypothese sprechen jedoch folgende Ergebnisse:

Johnsen und Nielsen (1978) konnten eine signifikante Korrelation zwischen gemessenem cAMP und Proteingehalt im Zellniederschlag nachweisen. Da die Proteinmenge ein Maß für die Menge der gemessenen Zellagen darstellt, kamen die Autoren zu dem Schluß, daß cAMP sowohl unter Ruhe- als auch stimulierten Bedingungen auf alle Zellagen gleichmäßig verteilt ist. Dies bedeutet gleichzeitig, daß die hormoninduzierten Stoffwechselprozesse offensichtlich in allen Zellagen gleichmäßig ablaufen.

Aufgrund dieser Überlegungen sollte es somit von untergeordneter Bedeutung sein, wenn bei dem hier dargestellten Präparationsverfahren vorwiegend nur die oberflächlich gelegenen Zellschichten des Froschhautepithels vollständig erfaßt wurden.

V.2.3. Aufschluß der Epithelzellen

Der nächste wichtige Schritt bei der Präparation der abgekratzten Epithelzellen war der Zellaufschluß und die Proteindenaturierung durch Einbringen der stickstoffgekühlten Epitheltrümmer in 500 µl kochendes Bidest und anschließende Inkubation im siedenden Wasserbad. Dieses Verfahren war auch von Johnsen und Nielsen (1978) und von Hall und Mitarbeitern (1976) als die einfachste und beste Form des Zellaufschlusses erachtet worden. Beide Gruppen fanden bei der Verwendung von Trichlorsäure oder Perchlorsäure niedrigere cAMP-Werte als bei der alleinigen Verwendung von kochendem Wasser. Die erniedrigten cAMP-Werte nach

Perchlor- und Trichlorsäurebehandlung wurden auf eine mögliche Interferenz dieser Substanzen mit dem Bestimmungsassay zurückgeführt (Cooper et al., 1972; Albano et al., 1974).

Da durch Bestimmung der Kaliumkonzentration im gewonnenen Extrakt das Zellvolumen erfaßt werden sollte, konnte ausschließlich bidestilliertes Wasser verwendet werden. Diesem bidestillierten Wasser waren 10 % Kalium-freier Phosphatpuffer (1/15 mol/l) mit pH 7,0 zugesetzt worden, da der pH von bidestilliertem Wasser nicht definiert ist, cAMP aber nur bei annähernd neutralem pH über längere Zeit in kochendem Wasser stabil bleibt (Rall und Sutherland, 1958; Sutherland und Rall, 1958).

V.2.4. Quantifizierung der gemessenen cAMP-Mengen

Die Quantifizierung der cAMP-Werte erfolgte durch die im zellfreien Überstand bestimmte Kaliumkonzentration. Die cAMP-Konzentration ergab sich somit in pmol cAMP/100 nmol K^+ . Um Verunreinigungen durch extrazelluläres Kalium möglichst gering zu halten, wurden die im Ringer inkubierten Froschhäute vor dem Einfrieren trockengetupft. Das verwendete Bidest mit dem Phosphat-Puffer wurde regelmäßig auf seinen Kaliumgehalt geprüft, zeigte jedoch keine Verunreinigungen in Bezug auf Kalium. In Abb. 10 sind die Kaliumkonzentrationen in den Extrakten gegen die Trockengewichte der Zelltrümmer für 20 Epithelpräparationen aufgetragen. Es zeigt sich eine signifikante Korrelation mit einem Korrelationskoeffizienten von 0,86.

Bei der Betrachtung der Regressionsgeraden fällt auf, daß diese nicht - wie zu erwarten wäre - durch den 0-Punkt geht, sondern um einen Betrag von etwa 0,10 mmol/l auf der Ordinate in Richtung zu höheren Kaliumwerten verschoben ist. Dabei dürfte es sich um einen systematischen Fehler handeln, der sich wie folgt erklären läßt: Die Epithelien wurden vor dem Einfrieren in flüssigem Stickstoff kurz trockengetupft um die Ringerlösung, in welche die Haut inkubiert war, von der Oberfläche zu entfernen. Sicherlich kann es hierdurch nie zu einer vollständigen Entfernung des Ringers von der Oberfläche und aus dem Stratum corneum des Epithels kommen. Setzt man voraus, daß etwa 2,5 µl Ringer/cm² auf der Epitheloberfläche bzw. im Stratum corneum noch hängenbleiben, so ergibt dies bei einer Kaliumkonzentration von 2,5 mmol/l im Ringer und einer Epithelfläche von 4,9 cm² eine Menge von ungefähr 30 nmol Kalium, die zusätzlich in die 500 µl Homogenat gelangen, was somit 6 nmol Kalium pro 100 µl (= 0,06 mmol/l) bedeutet. Dieser Wert muß als unteres Limit angesehen werden, da er extrazelluläres Kalium in den Zwischenzellräumen des Epithels nicht miterfaßt. Die Verschiebung der Regressionsgeraden um den Betrag von etwa 0,1 mmol/l Kalium läßt sich daher leicht mit einer Kontamination durch extrazelluläres Kalium erklären.

Bei einer durchschnittlichen Kaliumkonzentration der Zell-extrakte von $1,44 \pm 0,29$ mmol/l ($n = 20$) bedeuten 0,10 mmol/l einen geringen Fehler von nur 7 %. Da überdies der Fehler in Kontrolle und Experiment in etwa gleich groß sein sollte, wurde bei der Auswertung keine entsprechende Korrektur der Kaliumwerte

vorgenommen.

Die gemessene Kaliummenge entspricht nur etwa der Hälfte des theoretisch für eine 35 μm dicke Epithelschicht zu erwartenden Wertes. Dieser Verlust an Zellmaterial erklärt sich durch unvollständiges Abkratzen und durch Verluste beim Einsammeln der Epithelstücke unter flüßigem Stickstoff.

Die enge Korrelation mit dem Trockengewicht belegt, daß die Kaliumkonzentrationen ein gutes Maß für die Menge an erfaßten Epithelzellen darstellt. Sie schließt zudem aus, daß grobe oder unsystematische Verunreinigungen stattgefunden haben. Die Steilheit der Beziehung zwischen Kalium- und Trockengewichtskonzentration entspricht einer zellulären Kaliumkonzentration von 136 mmol/kg Feuchtgewicht, unterstellt man ein Trockengewicht von 20g/100g FG. Dieser Wert stimmt gut mit Daten der Elektronenstrahlmikrosonde überein (Rick et al., 1978; Dörge et al., 1981). Auf Grund der sehr kurzen Inkubationszeit (5 Minuten) sind Änderungen der intrazellulären Kaliumkonzentration, die die Proportionalität zwischen Zellvolumen und Kaliummenge aufheben würden, noch nicht anzunehmen. Mit der Elektronenstrahlmikrosonde wurde gezeigt, daß die intrazelluläre Kaliumkonzentration unter AVP erst nach 20 - 30 Minuten einen neuen Gleichgewichtszustand erreicht, der etwa 15 - 20 % unter dem Ausgangswert liegt (Rick et al., 1984).

Aus obigen Überlegungen läßt sich somit schließen, daß die Messung von Kalium im Zellextrakt ein verwertbares Kriterium

darstellt für die Bestimmung der Menge der bei der Präparation erfaßten Epithelzellen. Im Vergleich zur Trockengewichtsbestimmung oder der Bestimmung des Proteingehalts der präparierten Zellen ist die flammenphotometrische Bestimmung von Kalium zudem weitaus weniger aufwendig.

V.3. Diskussion der Ergebnisse der cAMP-Messungen

AVP induziert - wie vielfach in der Literatur belegt (Sapirstein und Scott, 1973; Wiesmann et al., 1977; Schorderet et al., 1978; Johnsen und Nielsen, 1978, 1982) - sowohl an der Froschhaut als auch an der Krötenharnblase eine Erhöhung des transepithelialen Transports für Natrium und Wasser. Die hierbei beobachtbaren Veränderungen im Natriumtransport, gemessen durch den Kurzschlußstrom, konnten auch in den eigenen Versuchen nachvollzogen werden, wobei der durchschnittliche Anstieg des Kurzschlußstromes nach einmaliger Gabe von AVP (150 mU/ml) auf $230 \pm 54 \%$ des Ausgangswertes gut mit anderen Ergebnissen (Rick et al., 1984) übereinstimmt. Für beide Epithelien konnte nachgewiesen werden, daß dieser Anstieg des transzellulären Natriumtransports mit einer Erhöhung des intrazellulären cAMP-Gehalts verbunden ist.

Die anfänglichen Experimente dienten zur Klärung der Frage, ob mit der neuen Methode der Epithelzellpräparation die in der Literatur (Hall et al., 1976; Johnsen und Nielsen, 1978;

Schorderet et al., 1978) beschriebenen Ergebnisse nachvollzogen werden können.

Unter Kontrollbedingungen betrug die cAMP-Konzentration der Epithelzellen $0,58 \pm 0,24$ pmol cAMP/100 nmol K^+ . Bei der Inkubation mit AVP ergab sich ein durchschnittlicher cAMP-Anstieg um $0,24 \pm 0,20$ pmol cAMP/100 nmol K^+ , bei der Inkubation mit IBMX eine Erhöhung des intrazellulären cAMP-Gehalts um $0,53 \pm 0,39$ pmol cAMP/100 nmol K^+ . Diese Ergebnisse stehen in Einklang mit den gängigen Vorstellungen über den Wirkungsmechanismus der beiden Substanzen. Nach Vorstellung der Voruntersucher erhöht ADH über eine Aktivierung der Adenylcyclase den cAMP-Gehalt der Zelle; gleiches bewirkt IBMX über eine Hemmung des Abbaus. Werden beide Substanzen gleichzeitig gegeben, so addieren sie sich in ihrer Wirkung, was Abb. 24 deutlich veranschaulicht.

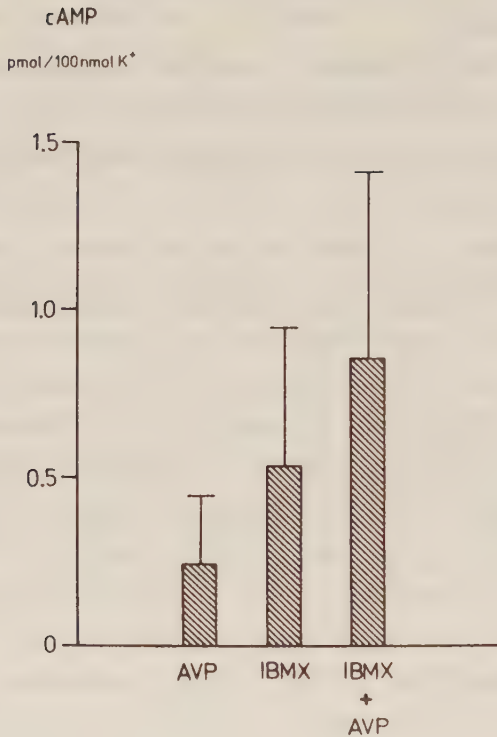


Abb. 24: Zunahme der cAMP-Konzentration im Epithelzellextrakt der Froschhaut unter verschiedenen Inkubationsbedingungen: nach Inkubation mit AVP (150 mU/ml, 5 Minuten) (AVP), nach Inkubation mit IBMX (10^{-5} M, 5 Minuten) (IBMX) und bei gleichzeitiger Anwesenheit von AVP und IBMX (AVP+IBMX). Dieser Abbildung liegen die Abb. 12 - 14 zugrunde.

Bei einem Vergleich dieser Ergebnisse mit denen anderer Laboratorien (Hall et al., 1976; Johnsen und Nielsen, 1978; Schoderet et al., 1978) stellt man jedoch fest, daß diese Autoren wesentlich drastischere Änderungen der intrazellulären cAMP-Spiegel beobachteten. Während der Anstieg der intrazellulären cAMP-Konzentration nach AVP in unseren Versuchen nur etwa 40 % betrug, fanden die anderen Untersucher Änderungen bis zu 300 % (siehe Tab. 5 und 6). Da diese Unterschiede schwerlich nur durch die unterschiedlichen Präparationsverfahren erklärt werden können, stellte sich die Frage nach möglichen Interferenzen im cAMP-Bestimmungsassay, die einen AVP-induzierten cAMP-Anstieg verwischen könnten.

Autor	Froschgattung	Original- angaben in	Kontrolle	ADH	PDE- Inhibition
Johnsen u. Nielsen 1978	Rana temporaria	pmol cAMP mg Protein	1,92 $\pm$ 0,11	c ₅ 5,81 $\pm$ 1,10	a ₇ 7,66 $\pm$ 0,33
Schorderet et al. 1978	Rana ridibunda	pmol cAMP mg Protein	2,48 $\pm$ 0,14		a ₇ 7,15 $\pm$ 1,44 b ₄ 4,13 $\pm$ 0,61
Hall et al. 1976	Rana temporaria	pmol cAMP mg FG	0,37 $\pm$ 0,09		a ₁ 1,25 $\pm$ 0,28
eigene Ergebnisse	Rana temporaria	pmol cAMP 100 nmol K ⁺	0,58 $\pm$ 0,24	d ₀ 0,82 $\pm$ 0,32	b ₁ 1,08 $\pm$ 0,57

Tab. 5: cAMP-Bestimmungen an der Froschhaut von verschiedenen Untersuchern. Angegeben sind die Originaldaten.

a = Inkubation mit Theophyllin

b = Inkubation mit IBMX (Isobutylmethylxanthin)

c = Inkubation mit AVT (Argininvasotocin)

d = Inkubation mit AVP (Argininvasopressin)

Autor	Froschgattung	Original- angaben in	Kontrolle	ADH	PDE- Inhibition
Johnsen Nielsen 1978	Rana temporaria	pmol cAMP mg Protein	$0,19 \pm 0,01$	$c_{0,58 \pm 0,11}$	$a_{0,76 \pm 0,03}$
Schorderet et al. 1978	Rana ridibunda	pmol cAMP mg Protein	$0,24 \pm 0,01$		$a_{0,71 \pm 0,14}$ $b_{0,41 \pm 0,06}$
Hall et al. 1976	Rana temporaria	pmol cAMP mg FG	$0,37 \pm 0,09$		$a_{1,25 \pm 0,28}$
eigene Ergebnisse	Rana temporaria	pmol cAMP 100 nmol K ⁺	$0,69 \pm 0,29$	$d_{0,98 \pm 0,38}$	$b_{1,30 \pm 0,68}$

Tab. 6: cAMP-Bestimmungen an der Froschhaut von verschiedenen Untersuchern. Alle angegebenen Werte sind auf die Einheit pmol cAMP/mg Feuchtgewicht (FG) umgerechnet worden, wobei der Umrechnung folgende Überlegungen zugrundelagen:

1. 1mg Protein entspricht 10 mg FG
2. 120 nmol K⁺ entsprechen etwa 1 mg FG

a - d siehe Tab. 5.

V.3.1. Interferenzen im cAMP-Bestimmungssassay

Ergebnisse bei Verwendung von Phosphodiesterase (PDE)

Rein theoretisch müßte der cAMP-Gehalt eines Zellextrakts, der zuvor genügend lange mit PDE behandelt wurde, verschwindend klein sein. In Abb. 15 ist gezeigt, daß dies zumindest bei unseren Messungen nicht der Fall ist, da sich der Gehalt an gemessenem cAMP nach Inkubation mit PDE nur um durchschnittlich 36 % erniedrigt (siehe Tab. 3). Für dieses Ergebnis ergeben sich 2 Erklärungsmöglichkeiten:

- (a) Die PDE ist nicht in ausreichendem Maße aktiv, oder aber
- (b) mit dem Proteinbindungsassay interferieren Substanzen, die einen zu hohen basalen cAMP-Spiegel vortäuschen.

Zur Klärung dieses Problems wurde der in Abb. 16 veranschaulichte Wiederfindungsversuch durchgeführt. Aus diesem Versuch geht hervor, daß sich mit dem cAMP-Assay zu einem Zellextrakt zugefügtes cAMP nachweisen ließ und daß zum anderen zugefügte PDE die cAMP-Konzentration auf Werte zu reduzieren vermochte, die etwas unterhalb des Ausgangswertes lagen.

Aus diesem Ergebnis muß man folgern, daß zum Extrakt zugegebene PDE in der Lage ist, alles im Extrakt befindliche cAMP abzubauen. Es erscheint daher wahrscheinlicher, daß mit dem cAMP-Bestimmungsansatz auch andere Substanzen als cAMP erfaßt werden und somit zu hohe basale cAMP-Werte angezeigt werden.

Ergebnisse bei zusätzlicher Anwendung verschiedener Reinigungsverfahren

In der Literatur (Krishna et al., 1968; Ramachandran, 1971) werden verschiedene Methoden beschrieben, um Substanzen, die den cAMP-Assay stören könnten, aus den betreffenden Zellextrakten zu entfernen. Nach Ramachandran (1971) bleiben Stoffe, die die cAMP-Messung eventuell stören, v.a. Nukleotide, an neutralem Aluminiumoxid haften, während cAMP mit Tris-HCl-Puffer von pH 7,4 problemlos wieder ausgewaschen werden kann. Wie jedoch Abb. 20 verdeutlicht, kommt es nach Anwendung dieses Reinigungsverfahrens bei vorhergehender Behandlung mit PDE in unseren Experimenten nicht zur Verringerung des PDE-insensitiven Anteils. Das Ergebnis entspricht dem bei alleiniger Inkubation mit PDE ohne Reinigungsverfahren, d.h. es kommt lediglich zu einer Reduzierung des gemessenen cAMP um 38 %. Ein reinigender Effekt durch Inkubation mit Al_2O_3 scheint in unserer Präparation somit nicht gegeben zu sein.

Deutlich bessere Ergebnisse bringt das von Krishna et al. (1968) beschriebene Reinigungsverfahren mit Bariumhydroxid und Zinksulfat. Dies verdeutlichen die Abb. 17 und 19. Wird das Zellhomogenat nur mit Bariumhydroxid und Zinksulfat behandelt, so lassen sich im Vergleich zum unbehandelten Kontrollextrakt nur noch etwa 63 % der Substanzen wiederfinden, die der Assay als cAMP anzeigt (Abb. 17). Nach zusätzlicher Behandlung mit PDE reduziert sich dieser Wert durch Hydrolyse des wahren cAMP noch weiter auf 31 % (Abb. 19). Somit ist es durch die Reinigung mit

Bariumhydroxid und Zinksulfat möglich, einen nicht unerheblichen Teil der Substanzen, die mit dem cAMP-Assay interferieren, aus dem Zelleextrakt zu entfernen. Wahres cAMP wird durch das Reinigungsverfahren offensichtlich nicht erfaßt, da der PDE-empfindliche Anteil in etwa gleich bleibt. Eine völlige Elimination der störenden Substanzen ist jedoch auch mit diesem Verfahren nicht möglich, da immer noch etwa 30 % der im Assay angezeigten Substanzen zurückbleiben, die allerdings nicht cAMP entsprechen dürften.

Ergebnisse bei Verwendung von Aktivkohle

Eine Reihe von Experimenten diente dem Versuch, auch diesen letzten Bodensatz noch durch unspezifisch absorbierende Substanzen zu eliminieren. Auch Aktivkohle ist nicht in der Lage, den Bodensatz aus dem Zelleextrakt zu entfernen, da immer noch ca. 35 % der ursprünglich in der Kontrolle als cAMP gemessenen Substanzen zurückbleiben (siehe Abb. 17 B). Eine geringe Verbesserung des Resultats läßt sich bei gleichzeitiger Anwendung von Aktivkohle und Bariumhydroxid- und Zinksulfat-Fällung erzielen. Aber selbst nach dieser kombinierten Behandlung finden sich noch 26 % der anfänglich gemessenen Konzentrationen als Bodensatz (siehe Abb. 17). Auch die Inkubation der Extrakte mit PDE und Aktivkohle brachte nur eine Reduktion der im Assay meßbaren Substanzen um 62 %, wie Abb. 18 zeigt.

V.3.2. Mögliche Fehlerquellen im Bestimmungsassay

Aufgrund dieser Ergebnisse stellt sich zwangsläufig die Frage, inwieweit eventuelle Fehler bei der Handhabung des Testansatzes zur Messung der cAMP-Konzentration vorliegen könnten. Um in einer Probe den cAMP-Gehalt von 0 pmol ablesen zu können, muß die Radioaktivität in der Probe (I_x) derjenigen des sog. Nullstandards (I_o) der Eichgeraden entsprechen. Da der Quotient I_o/I_x in allen Fällen größer 1 war, wurde in keiner Probe der Wert 0 erreicht. Daraus folgt gleichzeitig, daß I_o immer größer als I_x war. Folgende Fehler bei der Zusammensetzung des Testansatzes würden zu einer derartigen Fehlbestimmung führen:

- (1) Bei der Zusammensetzung des I_o -Wertes der Eichgeraden wird zuviel an radioaktiv markiertem cAMP zugegeben. Folge davon ist eine erhöhte Radioaktivität und damit ein zu hohes I_o .
- (2) Es erfolgt eine erhöhte Zugabe von cAMP-bindendem Protein zum Testansatz für I_o . Damit kann mehr Radioaktivität gebunden werden, I_o wird vergrößert.
- (3) Bei der Pipettierung des Testansatzes für die Probe, in der sich theoretisch kein cAMP befindet, wird zu wenig an ^3H -cAMP zugegeben. Eine geringere meßbare Radioaktivität ist die Folge, der Quotient I_o/I_x wird zwangsläufig größer als 1, der cAMP-Gehalt somit größer als 0 pmol.
- (4) Analog zu (2) erfolgt bei der Pipettierung des Testansatzes für die Probe mit einer cAMP-Konzentration von

0 pmol eine zu geringe Zugabe von bindendem Protein. Die dadurch erniedrigte Bindungskapazität für ^3H -cAMP bewirkt eine erniedrigte Radioaktivität I_x mit den selben Konsequenzen wie unter (1) bis (3).

Folgende Beobachtungen sprechen gegen diese unter (1) bis (4) dargestellten Fehlermöglichkeiten: Trotz Verwendung von insgesamt 4 jeweils neuen Testansätzen waren die Eichgeraden sehr gut reproduzierbar (siehe Abb. 9, Tab. 2). Diese gute Reproduzierbarkeit wäre nicht zu erwarten gewesen, falls einer der oben aufgeführten Fehler gemacht worden wäre. Außerdem wurde bei allen Proben und Standards eine Doppelbestimmung durchgeführt. Eine ausgeprägte Diskrepanz der beiden Werte war nicht zu beobachten. Ein drastischer Pipettierfehler, der zur Verfälschung der Ergebnisse in dem oben diskutierten Sinne geführt hätte, kann daher ausgeschlossen werden. Gegen eine Beeinflussung der Testergebnisse im Sinne der unter (3) und (4) dargestellten Möglichkeiten spricht außerdem die Tatsache, daß in keinem der 19 Versuche zur Entfernung von cAMP bzw. der interferierenden Substanzen der cAMP-Wert von Null erreicht werden konnte.

Zusammenfassend läßt sich somit folgendes festhalten:

1. In den Epithelzellextrakten zur Bestimmung der intrazellulären cAMP-Konzentrationen befindet sich ein mit großer Wahrscheinlichkeit nicht aus cAMP bestehender Bodensatz. Dadurch werden experimentell erzeugte Änderungen der wahren cAMP-Konzentration prozentual zu

niedrig angezeigt.

2. In unseren Versuchen war es nicht oder nur teilweise möglich mit Hilfe verschiedener Reinigungsverfahren den unspezifischen Bodensatz aus dem Zellextrakt zu entfernen.
3. Aktivkohle, die unselektiv höhermolekulare Substanzen absorbiert, ist nicht in der Lage, die den Bodensatz bildenden Substanzen vollständig zu binden.
4. Fehler bei der Pipettierung der Testansätze, die einen Bodensatz vortäuschen könnten, sind unwahrscheinlich.

Bei den Substanzen, die durch den cAMP-Assay im Extrakt der Froschhautepithelien erfaßt werden, dürfte es sich um drei, anteilmäßig etwa gleich große Anteile handeln (siehe Abb. 25):

- A) Bei dem PDE-empfindlichen Anteil handelt es sich um cAMP.
- B) Ein zweiter Anteil kann durch Fällung mit Zinksulfat und Bariumhydroxid eliminiert werden. Es handelt sich hierbei nach Krishna et al., (1968) wahrscheinlich um Nukleotide und anorganische Phosphate, die durch die Fällung erfaßt werden, während cAMP im Überstand verbleibt.

Die beiden oben dargestellten Anteile werden wahrscheinlich auch durch Aktivkohle erfaßt. Aktivkohle wurde von Brown (Brown et al., 1971) zur Absorption von cAMP verwendet und kann wohl auch andere Nukleotide binden.

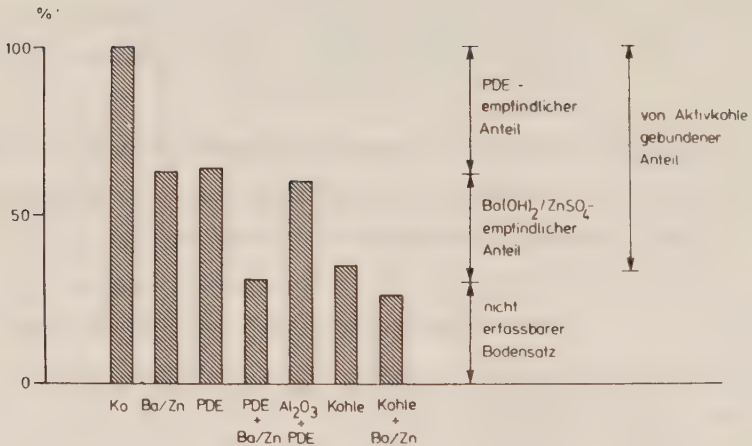


Abb. 25: Relative cAMP-Konzentrationen im Epithelzellextrakt der Froshhaut unter verschiedenen experimentellen Bedingungen. Bezugsgröße ist die cAMP-Konzentration eines völlig unbehandelten Extraktes (= 100 % = Ko). Ba/Zn = nach zweimaliger Reinigung mit $\text{Ba}(\text{OH})_2 + \text{ZnSO}_4$; PDE = nach Inkubation mit PDE (278 mU/ml, 30 Minuten, 37°C); Al_2O_3 = nach Behandlung mit Al_2O_3 ; Kohle = nach Inkubation mit Aktivkohle (20 Minuten bei Zimmertemp.).

Diese Graphik stellt eine Zusammenfassung der Abb. 15 und Abb. 17 - 20 dar.

- C) Bei dem dritten Anteil handelt es sich um Substanzen, die in unseren Experimenten weder mit den verschiedenen

Reinigungsverfahren noch mit Aktivkohle eliminiert werden konnten, wohl aber mit dem Assay interferieren. Über die chemische Natur dieser Substanzen können nur Vermutungen angestellt werden. Nach Geisler (Geisler et al., 1977) könnte es sich dabei um Magnesium- oder Kalziumionen handeln, die in höherer Konzentration die Bindungsreaktion von cAMP und bindendem Protein beeinflussen können.

Man muß also davon ausgehen, daß in den Kontrollhomogenaten 60 - 65 % der vom Assay erfaßten Substanzen nicht als cAMP angesehen werden können. Unter Berücksichtigung dieses Ergebnisses und unter der Annahme, daß AVP und IBMX primär nur den cAMP-Spiegel beeinflussen, ergibt sich auch bei der Anwendung dieser Substanzen ein eindeutigeres Ergebnis. Dies verdeutlicht Abb. 26, der die Ergebnisse aus Abb. 12 zugrundeliegen.

Zieht man etwa 60 % des cAMP-Gehalts der Kontrolle vom cAMP-Gehalt im Extrakt der Kontrollepithelien und der AVP-behandelten Epithelien ab, ergibt sich eine deutlich ausgeprägte Änderung der cAMP-Konzentration unter AVP. Es kommt zu einer Verdoppelung der cAMP-Konzentration im Gegensatz zu der ursprünglich gemessenen Zunahme um 40 %. Gleiches gilt natürlich auch für die Ergebnisse mit IBMX (Abb. 13) und IBMX + AVP (Abb. 14).

Die Annahme, daß die verschiedenen Substanzen primär den cAMP-Spiegel und nicht den Bodensatz beeinflussen, belegen die Ergebnisse nach Verwendung des Ca-Ionophors. In diesen Versuchen ergaben sich deutliche Änderungen im PDE-empfindlichen Anteil während der PDE-insensitive Anteil in allen Versuchen annähernd

konstant blieb (Abb. 21 und 22).

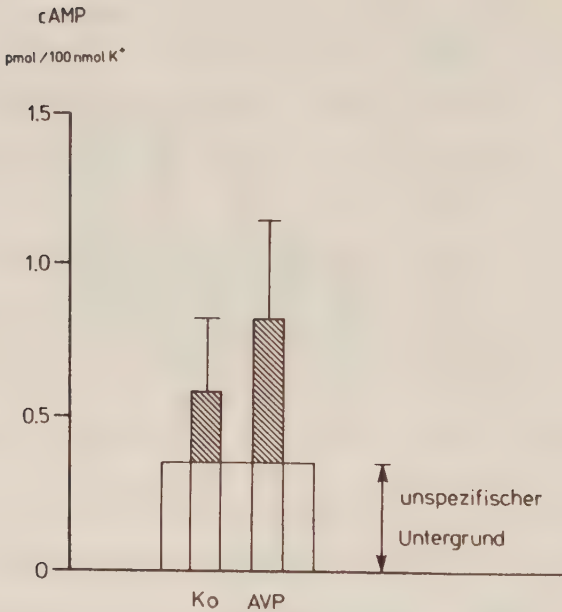


Abb. 26: cAMP-Konzentration im Epithelzellextrakt der Froschhaut unter Kontrollbedingungen (Ko) und nach Inkubation mit AVP (150 mU/ml, 5 Minuten). Nach Substraktion eines unspezifischen Untergrundes, der nicht cAMP entspricht (= ca. 60 % des Kontrollwertes), ergibt sich eine wesentlich ausgeprägtere Zunahme der wirklichen cAMP-Konzentration (schraffierte Säulen).

V.3.3. Vergleich mit anderen cAMP-Messungen an der Froschhaut

In Tab. 5 bis 7 werden die von anderen Autoren erhobenen Befunde den eigenen gegenübergestellt.

Johnsen und Nielsen (1978; 1982) führten ihre cAMP-Messungen ebenfalls an der Haut von *Rana temporaria* durch. Zur Reinigung wurde von diesen Autoren das Verfahren nach Ramachandran (1971) und zur cAMP-Bestimmung ein Protein-Bindungs-Assay verwendet.

Wie aus Tab. 6, in der alle bisherigen cAMP-Messungen an der Froschhaut zusammengefaßt und auf eine gemeinsame Einheit (pmol cAMP/mg FG) umgerechnet wurden, hervorgeht, zeigen sich deutliche Unterschiede zwischen den eigenen Ergebnissen und denen von Johnsen und Nielsen (1978). Eine gute Übereinstimmung zwischen den eigenen und den von Johnsen und Nielsen erhobenen Daten ergibt sich jedoch, wenn man bei den eigenen Daten den Bodensatz berücksichtigt (siehe Tab. 7). Dies könnte bedeuten, daß Johnsen und Nielsen bei ihren cAMP-Messungen nur wahres cAMP erfaßt haben. Damit werfen sich zwangsläufig folgende Fragen auf:

- (1) War bei diesen Untersuchern die Reinigungsmethode mit Al_2O_3 wirkungsvoll - im Gegensatz zu meinen Ergebnissen?
- (2) Hatte der verwendete cAMP-Assay eine bessere Selektivität für cAMP?
- (3) Befanden sich in den von diesen Untersuchern gewonnenen Epithelzellextrakten eventuell keine den cAMP-Assay störenden Substanzen?

Autor	Kontrolle	ADH	PDE- Inhibition
Johnsen u. Nielsen 1978	$0,19 \pm 0,01$	$^c 0,58 \pm 0,11$	$^a 0,76 \pm 0,03$
Hall et al. 1976	$0,37 \pm 0,09$		$^b 1,25 \pm 0,28$
eigene Ergebnisse	$0,28 \pm 0,09$	$^d 0,57 \pm 0,13$	$^b 0,89 \pm 0,23$

Tab. 7: cAMP-Konzentration in den Epithelzellen der Froschhaut von *Rana temporaria* unter verschiedenen experimentellen Bedingungen. Die Angaben der verschiedenen Untersucher sind auf die gemeinsame Einheit pmol cAMP/mg FG umgerechnet worden (siehe auch Tab. 6).

Bei den eigenen Ergebnissen wurden von den entsprechenden Werten in Tab. 6 60 % des cAMP-Gehalts der Kontrolle als unspezifischer Untergrund subtrahiert.

a - d siehe Tab. 5.

Die Beantwortung dieser Fragen gestaltet sich schwierig, weil Johnsen und Nielsen nicht den durch PDE hydrolysierbaren Anteil innerhalb ihrer cAMP-Konzentrationen im Epithelzellextrakt bestimmt haben. Wir erhalten somit keine Hinweise für die Existenz eines eventuell vorhandenen unspezifischen Bodensatzes. Deshalb kann auch keine Aussage über die Wirksamkeit der Reinigung mit Al_2O_3 in deren Versuchen getroffen werden.

Die Untersuchungen von Hall und seinen Mitarbeitern (1976) wurden ebenfalls an der Haut von *Rana temporaria* durchgeführt.

Allerdings wurde bei diesen Versuchen die gesamte Froschhaut homogenisiert und keinerlei Reinigungsverfahren verwendet. Es ist deshalb nicht verwunderlich, daß die so ermittelten cAMP-Konzentrationen unter den verschiedenen experimentellen Bedingungen - verglichen mit den eigenen korrigierten Daten und denen von Johnsen und Nielsen (1978) - etwas höhere Werte aufweisen (siehe Tab. 7). Die eigenen nicht korrigierten Daten lagen dagegen höher als die von Hall und Mitarbeitern angegebenen (siehe Tab. 6). Möglicherweise stand Hall und seinen Mitarbeitern ein cAMP-bindendes Protein mit besserer Selektivität für cAMP zur Verfügung.

Im Gegensatz zu den anderen Untersuchern erfolgten die cAMP-Bestimmungen von Schorderet (Schorderet et al., 1978) an der Haut von *Rana ridibunda*. Die Autoren verwendeten das von Krishna (Krishna et al., 1968) beschriebene Reinigungsverfahren bestehend aus Ionenaustauschchromatographie und Ba(OH)_2 - ZnSO_4 -Fällung. Obwohl diese Daten an einer anderen Spezies gewonnen wurden, ergibt sich eine gute Übereinstimmung mit den von Johnsen und Nielsen (1978) bestimmten cAMP-Konzentrationen (siehe Tab. 6).

Die Wirksamkeit der Ba-Zn-Fällung konnte in den eigenen Versuchen nachvollzogen werden. Da Schorderet diesem Reinigungsschritt zusätzlich noch eine Chromatographie voranstellte, ist anzunehmen, daß die angegebenen Werte mit großer Wahrscheinlichkeit nur cAMP darstellen.

Auf Grund des großen zeitlichen und technischen Aufwandes wurde in der vorliegenden Arbeit auf den Reinigungsschritt

mittels Chromatographie verzichtet.

Die cAMP-Messung erfolgte bei allen Untersuchern nach dem Prinzip des Protein-Bindungs-Assays, wobei die Trennung von gebundenen und nicht gebundenen cAMP auf zwei verschiedene Arten durchgeführt wurde:

1. Den Ergebnissen bei Johnsen und Nielsen (1978; 1982) und den eigenen Resultaten liegt die Trennung durch $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -Präzipitation des bindenden Proteins (Geisler et al., 1977) zugrunde.

Damit erscheint es unwahrscheinlich, daß der in den vorliegenden Versuchen beobachtete hohe unspezifische Anteil auf ein unzureichendes Trennungsverfahren zurückgeführt werden kann.

2. Schorderet und Mitarbeiter (1978) und Hall und Mitarbeiter (1976) verwendeten die von Brown (Brown et al., 1971) beschriebene Methode zur Trennung von gebundenem und ungebundenem cAMP durch Zusatz einer Suspension aus Kohle und Rinderserumalbumin.

Zusammenfassend läßt sich somit festhalten:

1. Die in den vorliegenden Untersuchungen erhaltenen korrigierten cAMP-Konzentrationen stimmen mit denen, die von Johnsen und Nielsen (1978) und Schorderet und Mitarbeitern (1978) mitgeteilt wurden, gut überein.
2. Die von Hall und Mitarbeitern (1976) angegebenen Werte liegen im Vergleich dazu etwas höher (Tab. 7). Mögliche Erklärung dafür könnte sein, daß Hall zum einen die gesamte

Froschhaut mit Bindegewebe homogenisierte und desweiteren auch kein Reinigungsverfahren verwendete. Andererseits muß auch festgehalten werden, daß die cAMP-Werte von Hall unter Kontrollbedingungen deutlich niedriger sind als die in dieser Arbeit erhobenen, unbereinigten Daten. Als mögliche Erklärung wäre denkbar, daß Hall und seinen Mitarbeitern ein cAMP-bindendes Protein mit besserer Selektivität für cAMP zur Verfügung stand.

3. Das Reinigungsverfahren unter Verwendung von $\text{Ba(OH)}_2\text{-ZnSO}_4$ (Krishna et al., 1968) ermöglicht eine Säuberung des Zell-extraktes von Substanzen, die den cAMP-Bestimmungsassay beeinflussen.
4. Die Frage, ob Al_2O_3 als Reinigungsverfahren wirksam ist, muß offen bleiben. In den eigenen Versuchen war dieser Reinigungsschritt ohne sichtbaren Erfolg.
5. Auf Grund dieser Ergebnisse erscheint die Anwendung von PDE bei cAMP-Messungen im Epithelzellextrakt mit Hilfe eines cAMP-bindenden Proteins als sinnvoll. Einerseits kann dadurch festgestellt werden, ob die cAMP-Bestimmung durch unspezifische Substanzen verfälscht wird. Andererseits ergeben sich Hinweise auf die Selektivität des cAMP-bindenden Proteins und auf die Wirksamkeit verschiedener Reinigungs-verfahren.

Auf Grund dieser Ausführungen wird im folgenden Kapitel nur noch der PDE-empfindliche Anteil innerhalb des Extraktes als cAMP angesehen.

V.3.4. Wirkungen des Ca-Ionophors A 23187 auf die cAMP-Konzentration in der Froschhaut

Der Einfluß des Ca-Ionophors A 23187 auf den transepithelialen Natriumtransport konnte bisher noch nicht endgültig aufgeklärt werden.

Während an der Krötenharnblase von mehreren Autoren (Wiesmann et al., 1977; Ludens, 1978; Taylor und Winderhager, 1979; Erlij et al., 1981) einstimmig über eine Hemmung des transepithelialen Natriumtransports nach Inkubation mit A 23187 berichtet wurde, sind die Ergebnisse, die an der Froschhaut erzielt wurden, uneinheitlich.

Während einige Untersucher (Nielsen, 1978; Balaban und Mandel, 1979; Erlij et al., 1981) eine Steigerung des Natriumtransports nach Gabe A 23187 beobachteten, fanden andere (Casavola und Svelto, 1985; Rick, persönliche Mitteilung) nach einem kurzen initialen Anstieg langfristig eine deutliche Hemmung des Natriumtransports.

Die eigenen cAMP-Bestimmungen und die von Rick durchgeführten Kurzschlußstrommessungen erfolgten im gleichen Labor und an Häuten der gleichen Froschspezies, zum Teil handelte es sich sogar um Tiere aus der gleichen Lieferung. Es erscheint daher sinnvoll, die Ergebnisse der cAMP-Messungen in erster Linie im Zusammenhang mit den in diesem Labor erhobenen Kurzschlußstrommessungen zu diskutieren. Außerdem ist es möglich, die neben den Kurzschlußstrommessungen gleichzeitig bestimmten Elektrolytkonzentrationen zur Klärung des Wirkungsmechanismus von A 23187

auf den transepithelialen Natriumtransport heranzuziehen.

Die für die vorliegende Arbeit relevanten Ergebnisse sind:

- (1) Alleinige Gabe von A 23187 ($3 \mu\text{M}$) führt langfristig zu einer Inhibition des Kurzschlußstromes, was einer Hemmung des transzellulären Netto-Natriumtransports entspricht.
- (2) Eine durch AVP induzierte Steigerung des Kurzschlußstromes wird durch Zugabe von A 23187 wieder rückgängig gemacht bzw. durch Vorinkubation mit dem Ionophor abgeschwächt.
- (3) Der durch AVP induzierte Anstieg der intrazellulären Natriumkonzentration wird durch den Ionophor ebenfalls wieder aufgehoben. Teilweise sinken die Natriumkonzentrationen in den AVP- und anschließend A 23187-inkubierten Zellen sogar unter Kontrollwerte ab.

Die Grundlage für die Wirkungen des Ca-Ionophors dürfte in einer Erhöhung der intrazellulären Kalziumkonzentration zu sehen sein. Dies belegen vor allem die Ergebnisse von Wiesmann und seinen Mitarbeitern (1977), die bei der Inkubation der Krötenharnblase mit A 23187 eine deutliche Steigerung der Aufnahme von radioaktivem Kalzium in die Epithelzelle beobachteten. Auch für die Froschhaut wurde von verschiedenen Autoren (Nielsen, 1976; 1978; Balaban und Mandel, 1979; Erlij et al., 1981; Casavola und Svelto, 1985) eine Erhöhung der intrazellulären Kalziumkonzentration durch Ionophore angenommen.

Die in den vorliegenden Versuchen beobachtete Zunahme des intrazellulären cAMP-Gehalts bei Inkubation mit dem Ionophor (siehe Abb. 22) wäre eine plausible Erklärung für die Steigerung des Kurzschlußstromes an der Froschhaut, wie sie von einigen Untersuchern beobachtet wurde (Nielsen, 1978; Balaban und Mandel, 1979).

Wurden die Häute gleichzeitig in Ionophor und AVP bzw. Ionophor und IBMX inkubiert, so ergab sich eine zusätzliche Steigerung der intraepithelialen cAMP-Konzentrationen (siehe Abb. 21 und 22). Da sowohl AVP als auch IBMX bei gleichzeitiger Inkubation mit dem Ionophor zu einem zusätzlichen cAMP-Anstieg führen, muß man davon ausgehen, daß die durch den Ionophor verursachte Erhöhung der intrazellulären Kalziumkonzentration weder an der durch AVP beeinflussten Adenylcyclase noch am cAMP-abbauenden Enzymsystem der PDE seinen primären Angriffspunkt besitzt.

Eine mögliche Erklärung für diese Beobachtung könnte ein von Erlij und Mitarbeitern (1981) vorgeschlagenes Modell bieten, wonach die Erhöhung des intrazellulären Kalziums durch den Ionophor zu einer gesteigerten intrazellulären Prostaglandinsynthese führt, was die Autoren mit einer erhöhten Prostaglandinfreisetzung aus den Epithelzellen unter der Einwirkung des Calcium-Ionophors belegten.

Die Richtigkeit dieser Hypothese wird auch durch die Untersuchungen von Casavola und Svelto (1985) an der Haut von *Rana esculenta* gestützt. Diese Autoren fanden, daß die Effekte von A 23187 auf den transzellulären Natriumtransport durch vorherige Gabe von Prostaglandin-Synthetase-Hemmern (Indomethacin) aufgehoben

ben werden konnten, während andere entzündungshemmende Substanzen, wie z.B. Hydrokortison, die die Bereitstellung von Arachidonsäure für die Prostaglandinsynthese herabsetzen, keinen Einfluß auf die Ca-Ionophor-Wirkung auf den Natriumtransport zeigten. Sie folgerten daraus, daß die erhöhte intrazelluläre Kalziumkonzentration durch den Ca-Ionophor über eine Aktivierung der Prostaglandinsynthetase zu einer erhöhten intrazellulären Prostaglandinproduktion führt.

Schon Lipson und Sharp (1971) konnten zeigen, daß Prostaglandine eine wichtige Rolle bei der Regulation des transepithelialen Natriumtransports spielen. Folgende Beobachtungen weisen desweiteren darauf hin, daß die Prostaglandine bei der Regulation des transepithelialen Natriumtransports an der Froschhaut eine Rolle spielen:

1. Das Froschhautepithel besitzt ein Prostaglandinsystem. Dies konnte durch den Nachweis der Freisetzung von Prostaglandinen aus der Froschhaut unter bestimmten experimentellen Bedingungen bewiesen werden (Hall et al., 1976; Erlij et al., 1981).
2. Exogen applizierte Prostaglandine (PGE_1 und PGE_2) stimulieren den transepithelialen Natriumtransport (Lipson und Sharp, 1971; Hall et al., 1976; Els und Helman, 1981).
3. Prostaglandinsynthesehemmer wie Indomethacin oder Acetylsalicylsäure hemmen den transzellulären Natriumtransport (Hall et al., 1976; Erlij et al., 1981).

Da zudem nachgewiesen werden konnte, daß diese Steigerung des transepithelialen Natriumtransports durch Prostaglandine mit einer Erhöhung des intrazellulären cAMP verbunden ist (Lipson und Sharp, 1971; Omachi et al., 1974; Hall et al., 1976; Schlondorff et al., 1981) liegt der Schluß nahe, daß die durch Ionophor hervorgerufene Erhöhung der intrazellulären Kalziumkonzentration und die damit gesteigerte Prostaglandinproduktion in einem weiteren Schritt zu einer Erhöhung der intrazellulären cAMP-Spiegel führt. Die Zunahme des intrazellulären cAMP führt normalerweise zu einer Steigerung der transepithelialen Natriumtransports, hervorgerufen durch eine Zunahme der Natrium-leitenden Kanäle in der apikalen Zellmembran (Li et al., 1982) oder durch Rekrutierung eines bereits existierenden Pools von "elektrisch stillen" Kanälen (Cuthbert und Shum, 1974, 1975).

Die Tatsache, daß AVP und Prostaglandine unabhängig voneinander zu einer Zunahme der cAMP-Konzentration führen, läßt vermuten, daß beide Substanzen ein eigenes, unabhängig voneinander stimulierbares Adenylcyclasesystem besitzen (Lipson und Sharp, 1971).

Dem gegenüber steht die Beobachtung, daß die Inkubation der Froschhaut mit A 23187 langfristig zu einer Hemmung des Kurzschlußstromes und damit des transzellulären Natriumtransportes führt (Casavola und Svelto, 1985; Rick, persönliche Mitteilung). Als Erklärung für diese Transporthemmung an der Froschhaut kann ein von Grinstein und Erlij (1978) entwickeltes Modell dienen. Dieses Modell, das auch von anderen Autoren bekräftigt werden konnte (Taylor und Windhager, 1979; Chase und

Al Awquati, 1981, 1984; Arruda et al., 1982), wird schematisch in Abb. 27 wiedergegeben.

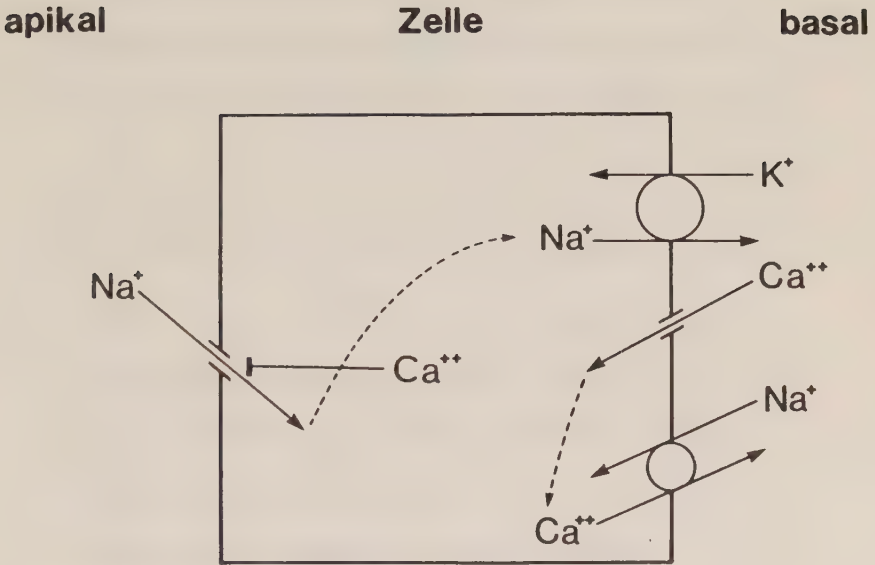


Abb. 27: Modell zur Regulation des transepithelialen Natriumtransports durch Kalziumionen. Nähere Angaben im Text.

Nach diesem Modell wird der transepitheliale Natriumtransport, der auf einem passiven zellulären Natriumeinstrom über die apikale und einem aktiven Auswärtstransport über die basolaterale Membran beruht, durch die intrazelluläre Kalziumkonzentration

reguliert. Eine Erhöhung der intrazellulären Kalziumkonzentration führt zu einer Abnahme der Natriumleitfähigkeit in der apikalen Membran und damit zu einer Verminderung des transepithelialen Natriumtransports. Reguliert wird die zelluläre Kalziumkonzentration über den zellulären Zustrom von Kalzium über einen Kalziumkanal und den zellulären Ausstrom über einen Na-Ca-Gegentransport an der basolateralen Zellmembran. Die Existenz dieses Na-Ca-Gegentransports in der basolateralen Zellmembran konnte von Chase und Al Awquati (1981) nachgewiesen werden.

Somit ruft der Ca-Ionophor an der apikalen Zellmembran über eine Erhöhung der intrazellulären Kalziumkonzentration zwei gegensinnige Effekte hervor: Während zum einen die Zunahme der intrazellulären Kalziumkonzentration über einen erhöhten cAMP-Spiegel zu einer Zunahme der natriumleitenden Kanäle an der apikalen Membran führt, bewirkt der Kalziumanstieg per se eine Abnahme der Leitfähigkeit dieser Natriumkanäle. Die Wirkungen des Ionophors auf den transepithelialen Natriumtransport wären dann so zu verstehen, daß in einer Anfangsphase der cAMP-Effekt, im weiteren Verlauf allerdings der hemmende Kalziumeffekt überwiegt.

Ganz ähnliche Überlegungen wie für den Ionophor alleine sollten auch für die Kombination von Ionophor mit Substanzen, die die intrazelluläre cAMP Produktion stimulieren (z.B. AVP und IBMX), gelten. Die steigernde Wirkung dieser Substanzen auf den transzellulären Natriumtransport sollte letztendlich durch die Ionophor-Wirkung überlagert werden, was auch die Kurzschlußstrommessungen (Casavola und Svelto, 1985; Rick, persönliche Mitteilung) belegen, die langfristig eine Hemmung des Natrium-

transports zeigen.

Die Beobachtung, daß es in zuerst mit AVP und dann mit Ca-Ionophor behandelten Epithelien zu einer Reduktion intrazellulärer Natriumkonzentrationen unter Kontrollwerte kommen kann, ist ein eindeutiges Indiz dafür, daß die Erhöhung des intrazellulären Kalziumspiegels durch Ca-Ionophor primär keine Hemmung der basolateral gelegenen Na-K-ATPase hervorruft (siehe auch Taylor und Windhager, 1979; Grinstein und Erlij, 1981; Arruda et al., 1982; Windhager und Taylor, 1983). In einem solchen Falle sollte nämlich die durch AVP induzierte Erhöhung der intrazellulären Natriumkonzentration (Rick et al., 1984) nach Ionophor-Inkubation weiter nachweisbar oder sogar verstärkt sein.

Anhand dieser Überlegungen liegt der Schluß nahe, daß die intrazellulären Kalziumionen einen wichtigen Beitrag zur Regulation des transepithelialen Natriumtransportes leisten. Durch die Koppelung von Natrium- und Kalziumionen entsprechend dem Natrium-Kalzium-Interaktionsmodell (siehe Abb. 27) führt die Erhöhung der intrazellulären Natriumkonzentration in einem weiteren Schritt zu einer Zunahme der Kalziumkonzentration in der Zelle. Die Kalziumionen ihrerseits haben einen hemmenden Einfluß auf die Leitfähigkeit der apikalen Zellmembran. Somit ist die Epithelzelle vor einem überschießenden Einstrom an Natriumionen geschützt, die intrazelluläre Natriumkonzentration kann nur bis zu einem für die Zelle tolerablen Wert gesteigert werden und die Zelle kann sich so ihre Funktionfähigkeit auch unter extremen Bedingungen erhalten.

Für die Beobachtung, daß es bei gleichzeitiger Anwesenheit von Ionophor, AVP und IBMX im Vergleich zur Inkubation mit nur zwei Substanzen nicht zu einer weiteren Erhöhung der intrazellulären cAMP-Spiegel kommt (siehe Abb. 21), gibt es prinzipiell folgende Erklärungsmöglichkeiten:

1. Es kommt - wie bei vielen biochemisch-enzymatischen Schritten - zur sog. Endprodukthemmung, d.h. das Endprodukt der enzymatischen Reaktion, in unserem Fall cAMP, hemmt das produzierende System, die Adenylcyclase.
2. Ein Mangel an ATP als Substrat für die Adenylcyclasen, die durch Prostaglandine und AVP aktiviert ATP in cAMP umwandeln.

Die Tatsache, daß bereits geringe cAMP-Erhöhungen nach alleiniger Inkubation mit AVP zu einer maximalen Steigerung des transepithelialen Natriumtransports führen (siehe Abb. 21 und 11), läßt es biologisch sinnvoll erscheinen, daß eine überschießende Produktion von cAMP vermieden wird. Somit würde die Endprodukthemmung eine durchaus sinnvolle Erklärung dafür liefern, daß der intrazelluläre cAMP-Spiegel auch durch drei unabhängig voneinander wirkende Substanzen nicht beliebig gesteigert werden kann.

Allerdings kann auch ein Mangel an ATP als Ursache für den fehlenden cAMP-Anstieg nicht ausgeschlossen werden, da zum einen die Ionophore den mitochondrialen Stoffwechsel negativ beeinflussen (Reed und Lardy, 1972; Pressman, 1974) und da zum anderen die Froschhäute bei den Versuchen mit A 23187 lange in vitro

inkubiert wurden.

VI. Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wird im ersten Teil ein spezielles Präparationsverfahren zur Gewinnung von isolierten Epithelzellen der Froschhaut für die Messung intraepithelialer cAMP-Konzentrationen beschrieben. Dieses Verfahren hat gegenüber den früher verwendeten Techniken den Vorteil, daß die Experimente an der intakten Froschhaut durchgeführt werden können. Die Isolierung der Epithelzellen zur Messung der intrazellulären cAMP-Konzentration erfolgt erst im Anschluß an die Inkubation der Froschhaut.

Desweiteren konnte in den vorliegenden Untersuchungen nachgewiesen werden, daß der verwendete cAMP-Bestimmungsassay außer cAMP auch andere im Epithelzellextrakt befindliche Substanzen erfaßt. Die in der Literatur beschriebenen Reinigungsverfahren zur Elimination solcher Substanzen waren in den eigenen Versuchen entweder nur teilweise oder aber gar nicht wirksam. Deshalb erscheint es sinnvoll, bei cAMP-Messungen, die unter Verwendung eines Protein-Bindungs-Assays erfolgen, sowohl die Selektivität der Proteinbindung im Assay für cAMP als auch die Wirksamkeit verschiedener Reinigungsverfahren zu prüfen. Dies kann, wie in der vorliegenden Arbeit gezeigt wurde, durch vorherige Inkubation der Epithelzellextrakte mit Phosphodiesterase erfolgen.

In der vorliegenden Arbeit wurde bei der Beantwortung der biologischen Fragestellung nur der PDE-empfindliche Anteil innerhalb der vom Assay angezeigten cAMP-Konzentration als wahres cAMP betrachtet.

In einem weiteren Schritt erfolgte die Untersuchung der Wirkung des Ca-Ionophors A 23187 auf die intrazelluläre cAMP-Konzentration. Dabei konnte festgestellt werden, daß der Ionophor zu einer deutlichen Erhöhung der intraepithelialen cAMP-Konzentration von 0,20 auf 0,56 pmol cAMP/100 nmol K^+ führt. IBMX und AVP bewirken auch in Anwesenheit von A 23187 eine weitere Erhöhung der intraepithelialen cAMP-Konzentration. Aufgrund dieser Ergebnisse und unter Berücksichtigung entsprechender Befunde in der Literatur liegt der Schluß nahe, daß bei den in dieser Arbeit verwendeten Froschhäuten der Ca-Ionophor und die durch ihn verursachte Erhöhung der intrazellulären Kalziumkonzentration über eine erhöhte intrazelluläre Prostaglandinsynthese in der Epithelzelle zu einer Erhöhung der cAMP-Konzentration führt.

Da der Anstieg des intrazellulären cAMP normalerweise mit einer Stimulation des Natriumtransports einhergeht, muß für die gleichzeitig in Kurzschlußstrommessungen beobachtete Hemmung des Natriumtransportes ein zweiter, cAMP-unabhängiger Mechanismus verantwortlich sein. Ein möglicher Mechanismus wäre die Hemmung des apikalen Natriumeinstroms durch den intrazellulären Kalziumanstieg; eine Modellvorstellung, die im Sinne einer Autoregulation des transepithelialen Natriumtransports mittels eines Na-Ca-Austauschmechanismus in Epithelzellen diskutiert wird.

Bisher gibt es nur indirekte Hinweise, daß die Wirkung der Ca-Ionophore über eine Erhöhung intrazellulärer Kalziumspiegel erfolgt. Daher wäre die exakte Bestimmung intrazellulärer Kalziumkonzentrationen von großer Bedeutung, sowohl für die genauere

Beantwortung der Frage der Wirkungsmechanismen der Ca-Ionophore, als auch zur detaillierten Erforschung der Frage über welche Mechanismen Kalziumionen den transzellulären Natriumtransport beeinflussen.

VII. Literaturverzeichnis

J. Aceves

Sodium pump stimulation by oxytocin and cyclic AMP in the isolated epithelium of the frog skin.

Pflügers Arch. 371:211 (1977)

J. Aceves und D. Erlij

Sodium transport across the isolated epithelium of the frog skin.

J. Physiol. 212:195 (1971)

J.D.M. Albano, G.D. Barnes, D.V. Maudsley, B.L. Brown und

R.P. Etkins

Factors affecting the saturation assay of cyclic AMP in biological systems.

Analyt. Biochem. 60:130 (1974)

W.P. Argy, Jr., J.S. Handler und J. Orloff

Ca^{++} and Mg^{++} effects on toad bladder response to cyclic AMP, theophylline, and ADH analogues.

Am. J. Physiol. 213:803 (1967)

J.A.L. Arruda, S. Sabatini und Ch. Westenfelder

Serosal Na/Ca exchange and H^{+} and Na^{+} transport by the turtle and toad bladders.

J. Membrane Biol. 70:135 (1982)

R.S. Balaban und L.J. Mandel

Comparison of the effects of increased intracellular calcium and antidiuretic hormone on active sodium transport in frog skin: A study with the Calcium-Ionophore A 23187.

Biochim. Biophys. Acta 555:1 (1979)

P.J. Bentley

The effects of ionic changes on water transfer across the isolated urinary bladder of the toad *Bufo marinus*.

J. Endocr. 18:327 (1959)

P.J. Bentley

The effects of vasopressin on the short-circuit current across the wall of the isolated bladder of the toad, *Bufo marinus*.

J. Endocr. 21:161 (1960)

M.P. Blaustein

The interrelationship between sodium and calcium fluxes across cell membranes.

Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol. 70:33 (1974)

J. Bockaert, Ch. Roy und S. Jard

Oxytocin-sensitive adenylate cyclase in frog bladder epithelial cells: Role of calcium, nucleotides and other factors in hormonal stimulation.

J. Biol. Chem. 247:7073 (1972)

B.L. Brown, J.D.M. Albano, R.P. Ekins und A.M. Sgherzi

A simple and sensitive saturation assay method for the measurement of adenosine-3-5-cyclic monophosphate.

J. Biochem. 121:561 (1971)

E. Carafoli und M. Crompton

The regulation of intracellular calcium.

In: Current Topics in Membrane and Transport, Academic Press, Vol. 10:151 (Hrsg.) New York, San Francisco, London (1978)

N. Carasso, P. Favard, S. Jard und R. Rajerison

The isolated frog skin epithelium: I. Preparation and general structure in different physiological states.

J. Microsc. 10:315 (1971)

V. Casavola und M. Svelto

Ca^{++} regulation of Na^{+} active transport in frog skin: the role of prostaglandins.

IRCS Med. Sci. 13:192 (1985)

H.S. Chase, jr., Q. Al-Awqati

Regulation of the sodium permeability of the luminal border of toad bladder by intracellular sodium and calcium: Role of sodium-calcium exchange in the basolateral membrane.

J. Gen. Physiol. 77:693 (1981)

S.H. Chase, jr.

Does calcium couple the apical and basolateral membrane permeabilities in epithelia?

Am. J. Physiol. 247:F869 (1984)

W.H. Cook, D. Lipkin und R. Markham

The formation of a cyclic dianhydrodiadenylic acid by the alkaline degradation of adenosine-5-triphosphoric acid.

J. Am. Chem. Soc. 79:3607 (1957)

R.H. Cooper, M. McPherson und J.G. Schofield

The effects of prostaglandins on ox pituitary content of adenosine-3-5-cyclic monophosphate and the release of growth hormone.

Biochem. J. 127:143 (1972)

P.F. Curran, J. Zadunaisky und J.R. Gill, jr.

The effect of ethylenediaminetetraacetate on ion permeability of the isolated frog skin.

Biochim. Biophys. Acta 52:392 (1961)

P.F. Curran und J.R. Gill, jr.

The effect of calcium on sodium transport by frog skin.

J. Gen. Physiol. 45:625 (1962)

P.F. Curran, F.C. Herrera und W.J. Flanigan

The effect of Ca and Antidiuretic Hormone on Na transport across frog skin: II. Sites and mechanisms of action.

J. Gen. Physiol. 46:1011 (1963)

A.W. Cuthbert und W.K. Shum

Binding of amiloride to sodium channels in frog skin.

Mol. Pharmacol. 10:880 (1974)

A.W. Cuthbert und W.K. Shum

Effects of vasopressin and aldosterone on amiloride binding in toad bladder epithelial cells.

Proc. R. Soc. London B. 189:543 (1975)

A. Dörge, R. Rick und E. v. Arnim

Action of Bay g 2821 on transepithelial sodium transport of the frog skin.

Pharmathera. 1/6:341 (1977)

A. Dörge, R. Rick, U. Katz und K. Thureau

Determination of intracellular electrolyte concentrations in amphibian epithelia with the use of electron microprobe analysis.

In: Water Transport Across Epithelia, Alfred Benzon Symposium, Vol 15:36 (Hrsg. H.H. Ussing, N. Bindslev, N.A. Lassen und O. Sten-Knudsen), Munksgaard, Copenhagen (1981)

E. Du Bois-Reymond

Untersuchungen über tierische Elektrizität.

Berlin, 1848

W.J. Els und S.I. Helman

Vasopressin, theophylline, PGE_2 and indomethacin on active Na transport in frog skin: studies with microelectrodes.

Am. J. Physiol. 241:F279 (1981)

F.H. Epstein und R. Whittam

The mode of inhibition by calcium of cell membrane adenosine-triphosphatase activity.

Biochem. J. 99:232 (1966)

D. Erlij und J. Aceves

Sodium transport across the isolated epithelium of the frog skin.

Biophys. J. 9:A163 (1969)

D. Erlij

Solute transport across isolated epithelia.

Kidney Int. 9:76 (1976)

D. Erlij, L. Gersten und G. Sterba

Calcium, prostaglandin and transepithelial sodium transport.

J. Physiol. 320:136P (1981)

H.M. Fishman und R.I. Macey

Calcium effects in the electrical excitability of "split" frog skin.

Biochim. Biophys. Acta 150:482 (1968)

J.C. Foreman, J.L. Mongar und B.D. Gomperts

Calcium Ionophores and movement of calcium ions following the physiological stimulus to a secretory process.

Nature 245:249 (1973)

B. Frankenhäuser und A.L. Hodgkin

The action of calcium on the electrical properties of squid axons.

J. Physiol. 137:218 (1957)

G. Galeotti

Über die elektromotorischen Kräfte, welche an der Oberfläche tierischer Membranen bei der Berührung mit verschiedenen Elektrolyten zustande kommen.

Z. Phys. Chem. 49:542 (1904)

A. Geisler, R. Klysner, P. Thams und S. Christensen

A simple and inexpensive protein binding assay for cyclic AMP in biological materials.

Acta Pharm. Toxicol. 40:356 (1977)

D.B. Glass und E.G. Krebs

Protein phosphorylation catalyzed by cyclic-AMP-dependent and cyclic-GMP-dependent protein kinases.

Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol. 20:363 (1980)

S. Grinstein und D. Erlij

Intracellular calcium and the regulation of sodium transport in the frog skin.

Proc. R. Soc. Lond. B. 202:353 (1978)

A. Grosso und R.C. de Sousa

Vasopressin-like effects of psychotropic drugs in amphibian epithelia.

J. Membrane Biol. 305 (1978)

P.F. Gulyassy und I.S. Edelman

Hydrogen-ion dependence of the antidiuretic action of vasopressin, oxytocin and deaminoxytocin.

Biochim. Biophys. Acta 102:185 (1965)

W.J. Hall, J.P. O'Donoghue, M.G. O'Regan und W.J. Penny

Endogenous prostaglandins, adenosine-3-5-monophosphate and sodium transport across isolated frog skin.

J. Physiol. (London) 258:731 (1976)

J.S. Handler, R.W. Butcher, E.W. Sutherland und J. Orloff

The effect of vasopressin and of theophylline on the concentration of adenosine-3-5-phosphate in the urinary bladder of the toad.

J. Biol. Chem. 240:4524 (1965)

J.S. Handler, F.M. Perkins und J.P. Johnson

Studies of renal cell function using cell culture techniques.

Am. J. Physiol. 238:F1 (1980)

J.S. Handler

Vasopressin-prostaglandin interactions in the regulation of epithelial cell permeability to water.

Kidney Int. 19:831 (1981)

J.S. Handler und J. Orloff

Antidiuretic Hormone

Ann. Rev. Physiol. 43:611 (1981)

M.A. Hardy

Intracellular calcium as a modulator of transepithelial permeability to water in frog urinary bladder.

J. Cell. Biol. 76:787 (1978)

M.A. Hardy and D.R. DiBona

Extracellular Ca^{++} and the effect of antidiuretic hormone on the water permeability of the toad urinary bladder: An example of flow-induced alteration of flow.

J. Membrane Biol. 67:27 (1982)

J.S. Hayes and S.E. Mayer

Regulation of guinea pig heart phosphorylase kinase by cAMP, protein kinase and calcium.

Am. J. Physiol. 240:E340 (1981)

O. Hechter, S.Terada, T. Nakahara und G. Flouret

Neurhypophyseal hormone-reponsive renal adenylate cyclase.

II. Relationship between hormonal occupancy of neurohypophyseal hormone receptor sites and adenylate cyclase activation.

J. Biol. Chem. 253:3219 (1978)

F.C. Herrera und P.F. Curran

The effect of Ca and Antidiuretic Hormone on Na transport across frog skin: I. Examination of interrelationships between Ca and hormone.

J. Gen. Physiol. 46:999 (1963)

S. Hynie and G.W.G. Sharp

Adenyl cyclase in the toad bladder.

Biochim. Biophys. Acta 230:40 (1971)

M. Imbert, D. Chabardès, M. Montégut, A. Clique und F. Morel

Adenylate cyclase activity along the rabbit nephron as measured in single isolated segments.

Pflügers Arch. 354:213 (1975)

A. Isaacson und A. Sandow

Quinidine and caffeine effects on ^{45}Ca movements in frog sartorius muscle.

J. Gen. Physiol. 50:2109 (1967)

S. Jard und J. Bockaert

Stimulus-response coupling in neurohypophysial peptide target cells.

Physiol. Rev. 55:489 (1975)

A.H. Johnsen und R. Nielsen

Effects of antidiuretic hormone, arginine vasotocin, theophylline, filipin and A 23187 on cyclic cAMP in isolated frog skin epithelium (*Rana temporaria*).

Acta Physiol. Scand. 102:281 (1978)

A.H. Johnsen und R. Nielsen

Sodium nitroprusside induced cGMP accumulation in isolated frog skin epithelium. Effect on cAMP, hydroosmotic and natriferic response to antidiuretic hormone.

Acta Physiol. Scand. 108:373 (1980)

A.H. Johnsen und R. Nielsen

Is cAMP a second messenger of antidiuretic hormone?

Acta Physiol. Scand. 112:5A (1981)

A.H. Johnsen und R. Nielsen

Enhanced sensitivity to stimulation of sodium transport and cyclic AMP by antidiuretic hormone after Ca^{++} depletion of isolated frog skin epithelium.

J. Membrane Biol. 69:137 (1982)

A.M. Katz

Role of contractile proteins and sarcoplasmatic reticulum in the response of the heart to catecholamines: An historical review.

In: Advances in Cyclic Nucleotide Research Vol. 11:303 (Hrsg. P. Greengard und G.A. Robison), Raven Press, New York (1979)

L.I. Katzin

The ionic permeability of frog skin as determined with the aid of radioactive indicators.

Biol. Bull. 77:402 (1939)

J.B. Kirschner

The effect of atropine and the curares on the active transport of sodium by the skin of *Rana esculenta*.

J. Cell Comp. Physiol. 45:89 (1955)

V. Koefoed-Johnsen und H.H. Ussing

The nature of the frog skin potential.

Acta Physiol Scand. 42:298 (1958)

G. Krishna, B. Weiss und B.B. Brodie

A simple sensitive method for the assay of adenylyl cyclase.

J. Pharmacol. Exper. Therapeu. 163:379 (1968)

S.D. Levine, W.A. Kachadorian, D.N. Levin und D. Schlondorff

Effects of trifluoperazine on function and structure of toad urinary bladder: Role of calmodulin in vasopressin-stimulation of water permeability.

J. Clin. Invest. 67:662 (1981)

J.H.-Y. Li, L.G. Palmer, I.S. Edelman und B. Lindemann

The role of sodium-channel density in the natriuretic response of the toad urinary bladder to an antidiuretic hormone.

J. Membrane Biol. 64:77 (1982)

H.B. Lillywhite

Thermal modulation of cutaneous mucous discharge as a determinant of evaporative water loss in the frog, *Rana catesbeiana*.

Z. Vgl. Physiol. 73:84 (1971)

D. Lipkin, W.H. Cook und R. Markham

Adenosine-3-5-phosphoric acid: A proof of structure.

J. Am. Chem. Soc. 81:6198 (1959)

L.C. Lipson und G.W.G. Sharp

Effect of prostaglandin E_1 on sodium transport and osmotic water flow in the toad bladder.

Am. J. Physiol. 220:1046 (1971)

J.H. Ludens

Studies on the inhibition of Na transport in toad bladder by the Ionophore A 23187.

J. Pharmacol. Exp. Ther. 206:414 (1978)

A.J. Mia, N. Tarapoom, J. Carnes und T. Yorio

Alteration in surface substructure of frog urinary bladder by calcium Ionophore, verapamil and antidiuretic hormone.

Tissue & Cell 15:737 (1983)

F. Morel

Sites of hormone action in the mammalian nephron.

Am. J. Physiol. 240:F159 (1981)

L.J. Mullins

A mechanism for Na/Ca Transport.

J. Gen. Physiol. 70:681 (1977)

W. Nagel

Effects of antidiuretic hormone upon electrical potential and resistance of apical and basolateral membranes of frog skin.

J. Membr. Biol. 42:99 (1978)

R. Nielsen

Does the polyene antibiotic filipin act as a Ca-Ionophore, when added to the inside of the isolated frog skin.

Acta Physiol. Scand. Suppl. 440:72 (1976)

R. Nielsen

Effect of the polyene antibiotic filipin and the Ca-Ionophore A 23187 on sodium transport in isolated frog skin (*Rana temporaria*).

J. Membrane Biol. 33:1 (1978)

R.S. Omachi, D.E. Robbie, J.S. Handler und J. Orloff

Effects of ADH and other agents on cyclic AMP accumulation in toad bladder epithelium.

Am. J. Physiol. 226:1152 (1974)

J. Orloff, J.S. Handler und A.S. Preston

The similarity of effects of vasopressin, adenosine-3-5-phosphate (cyclic AMP) and theophylline on the toad bladder.

J. Clin. Invest. 41:702 (1962)

J. Orloff und J. S. Handler

The cellular mode of action of antidiuretic hormone.

Am. J. Med. 36:686 (1964)

D. Ottoson, F. Sjöstrand, S. Stenström und G. Svaetichin

Microelectrode studies on the EMF of frog skin related to electron microscopy of the dermo-epidermal junction.

Acta Physiol. Scand. 29:611 (1953)

M.J. Petersen und I.S. Edelman

Calcium inhibition of the action of vasopressin on the urinary bladder of the toad.

J. Clin. Invest. 43:583 (1964)

B.C. Pressman

Biological applications of Ionophores

Ann. Rev. Biochem. 45:501 (1976)

W.T. Prince, H. Rasmussen und M.J. Berridge

The role of calcium in fly salivary gland secretion analyzed with the Ionophore A 23187.

Biochim. Biophys. Acta 329:98 (1973)

R.M. Rajerison, M. Montegut, S. Jard und F. Morel

The isolated frog skin epithelium: Permeability characteristics and responsiveness to oxytocin, cyclic AMP and theophylline.

Pflügers Arch. 332:302 (1972)

T.W. Rall, E.W. Sutherland und J. Berthet

The relationship of epinephrine and glucagon to liver phosphorylase: IV. Effect of epinephrine and glucagon on the reactivation of phosphorylase in liver homogenates.

J. Biol. Chem. 224:463 (1957)

T.W. Rall und E.W. Sutherland

Formation of a cyclic adenine ribonucleotide by tissue particles.

J. Biol. Chem. 232:1065 (1958)

J. Ramachandran

A new simple method for separation of adenosine-3-5-cyclic monophosphate from other nucleotides and its use in the assay of adenylyl cyclase.

Anal. Biochem. 43:227 (1971)

F. Rawlins, L. Mateu, F. Fragachan und G. Whitembury

Isolated toad skin epithelium: Transport characteristics.

Pflügers Arch. 316:64 (1970)

P.W. Reed und H.A. Lardy

A 23187: A divalent cation Ionophore.

J. Biol. Chem. 247:6970 (1972)

E.W. Reid

Osmosis experiments with living and dead membranes.

J. Physiol. 11:312 (1890)

R. Rick, A. Dörge und W. Nagel

Influx and efflux of sodium at the outer surface of frog skin.

J. Membrane Biol. 22:183 (1975)

R. Rick, A. Dörge, E. von Arnim und K. Thureau

Electron microprobe analysis of frog skin epithelium: Evidence for a syncytial sodium transport compartment.

J. Membrane Biol. 39:313 (1978)

R. Rick, Ch. Roloff, A. Dörge, F.X. Beck und K. Thureau

Intracellular electrolyte concentrations in the frog skin epithelium: Effect of vasopressin und dependence on the Na concentration in the bathing media.

J. Membrane Biol. 78:129 (1984)

G.A. Robison, R.W. Butcher und E.W. Sutherland

Cyclic AMP

Academic Press, New York und London, (1971)

V.S. Sapirstein und W.N. Scott

Cyclic AMP and sodium transport: Quantitative and temporal relationships in toad urinary bladder.

J. Clin. Invest. 52:2379 (1973)

B.T. Scheer und M.W. Mumbach

The locus of the electromotive force in frog skin.

J. Cell Comp. Physiol. 55:259 (1960)

D. Schlondorff, C.P. Carvounis, M. Jacoby, J.A. Satriano und S.D. Levine

Multiple sites for interaction of prostaglandin and vasopressin in toad urinary bladder.

Am. J. Physiol. 241:F625 (1981)

M. Schorderet, A. Grosso und R.C. DeSousa

Intracellular cAMP: Hormone-induced changes in frog skin epithelium.

Experientia (Basel) 31:372 (1975)

M. Schorderet, A. Grosso und R.C. DeSousa

Cyclic AMP levels in isolated frog skin epithelium: Effects of phosphodiesterase inhibitors, oxytocin und catecholamines.

Molec. Cellul. Endocrin. 11:105 (1978)

L. Skjelvale, V.K. Nieder und E.G. Huff

Metabolic studies on frog skin epithelium.

J. Cell Comp. Physiol. 56:43 (1960)

P.L. Smith, M.J. Welsh, J.S. Stoff und R.A. Frizzell

Chloride secretion by canine tracheal epithelium: I. Role of intracellular cAMP levels.

J. Membrane Biol. 70:217 (1982)

R.C. DeSousa und A. Grosso

Interactions of diphenylhydantoin with norepinephrine, theophylline und cyclic AMP in frog skin.

Experientia 29:748 (1973)

E.W. Sutherland und T.W. Rall

The relation of adenosine-3-5-phosphate and phosphorylase to the actions of catecholamines and other hormones.

Pharmacol. Rev. 12:265 (1960)

E.W. Sutherland und T.W. Rall

Fractionation and characterization of a cyclic adenine ribonucleotide formed by tissue particles.

J. Biol. Chem. 232:1077 (1958)

A. Taylor

Effect of quinidine in the action of vasopressin.

Fed. Proc. 34:285 (1975)

A. Taylor und E.E. Windhager

Possible role of cytosolic calcium and Na-Ca-exchange in regulation of transepithelial sodium transport.

Am. J. Physiol. 236:F505 (1979)

I.G. Thompson und J.W. Mills

Isoproterenol-induced current changes in glands of frog skin.

Am. J. Physiol. 241:C250 (1981)

S. Torikai, M. Wang, K.L. Klein und K. Kurokawa

Adenylate cyclase and cell cyclic AMP of rat cortical thick ascending limb of Henle.

Kidney Int. 20:649 (1981)

H.H. Ussing

The active ion transport through the isolated frog skin in the light of tracer studies.

Acta Physiol. Scand. 17:1 (1949)

H.H. Ussing und K. Zerahn

Active transport of sodium as the source of electric current in the short-circuited isolated frog skin.

Acta Physiol. Scand. 23:110 (1951)

H.H. Ussing, D. Erlij und U. Lassen

Transport pathway in biological membranes.

Ann. Rev. Physiol. 36:17 (1974)

K.G. Walton, R.J. DeLorenzo, P.F. Curran und P. Greengard

Regulation of protein phosphorylation and sodium transport in toad bladder.

J. Gen. Physiol. 65:153 (1975)

W. Wiesmann, S. Sinha und S. Klahr

Effects of Ionophore A 23187 on base line and vasopressin-stimulated sodium transport in the toad bladder.

J. Clin. Invest. 59:418 (1977)

E.E. Windhager und A. Taylor

Regulatory role of intracellular calcium ions in epithelial Na transport

Ann. Rev. Physiol. 45:519 (1983)

Ying Ming Lin

Calmodulin

Molecul. Cellul. Biochem. 45:101 (1982)

J.A. Zadunaisky und M.A. Lande

Calcium content and exchange in amphibian skin and its isolated epithelium.

Am. J. Physiol. 222:1309 (1972)

Ich möchte an dieser Stelle Herrn Prof. Dr. med. Dr. h.c. Klaus Thureau für die Arbeitsmöglichkeit in seinem Institut herzlich danken.

Herrn Priv.-Doz. Dr. med. Roger Rick danke ich für die Überlassung des Themas und die Betreuung während meiner Arbeit. Desweiteren gilt mein Dank Herrn Prof. Dr. med. A. Dörge und Herrn Dr. med. F. Beck für ihre Anregungen und kritischen Diskussionen bei der Bewältigung anstehender Probleme.

Frau Brigitte Mayer möchte ich danken für ihre Hilfe bei den anfallenden Schreibarbeiten und für die Assistenz im Labor, den anderen Mitarbeitern im Labor für ihre Unterstützung und das freundliche Arbeitsklima. Zudem gilt mein Dank auch allen anderen Angehörigen des Physiologischen Instituts der Universität München, die zum erfolgreichen Abschluß dieser Arbeit beigetragen haben.

Lebenslauf

24.03.1960 geboren in Martinszell als erstes von vier Kindern
des Landwirts Anton Schratt und seiner Frau Gertrud

1966 - 1970 Besuch der Volksschule in Martinszell

1970 - 1971 Besuch der Verbandsschule Waltenhofen

1971 - 1980 Besuch des Allgäu-Gymnasiums in Kempten

1980 Allgemeine Hochschulreife

ab 1980 Studium der Medizin an der LMU München

1982 Beginn der Doktorarbeit am Physiologischen Institut
der LMU

